

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/
Handbuch für die folgenden Medizinprodukte:

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

Zur Anwendung in Kombination mit BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit is designed for the specific identification and differentiation of Influenza A, Influenza B (Flu A and/or B) and/or Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) in respiratory samples from patients with signs and symptoms of respiratory infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of Flu A, Flu B and/or RSV in combination with clinical and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for extraction of RNA and subsequent Real Time RT-PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ system. RNA from clinical specimens is detected using fluorescent reporter dye probes specific for Flu A, Flu B and RSV.

2. Summary and Explanation

Influenza viruses belong to the *Orthomyxoviridae* family and cause the majority of viral lower respiratory tract infections. Influenza A and B are a significant cause of morbidity and mortality worldwide, considering that elderly and compromised individuals are especially at risk of developing severe illness and complications such as pneumonia. People feel some or all of these symptoms: fever or feeling feverish/chills, cough, sore throat, nasal stuffiness and discharge, myalgia, headaches, and anorexia. The influenza viruses can be spread from person to person in two different ways: through the air (large droplets and aerosols from sneezing and coughing), and by direct or indirect contact.

Influenza A and B are an enveloped, single stranded RNA viruses that containing eight segmented strands of genome RNA, which typically encodes 11 or 12 viral proteins. The viral envelope, derived from the host plasma membrane, consists of a lipid bilayer containing transmembrane proteins, like hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), and matrix proteins M1 and M2. Influenza A viruses are further classified into subtypes based on the antigenicity of their "HA" and "NA" molecules, whereas Influenza B is divided into 2 antigenically and genetically distinct lineages, Victoria and Yamagata.

Human respiratory syncytial viruses (RSV) belong to the *Paramyxoviridae* family and are the most important viral agents of acute respiratory infections. RSV is an enveloped, nonsegmented, negative, single stranded linear RNA genome virus. Respiratory syncytial virus is a common contributor of respiratory infections causing bronchitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages. People often feel some or all of these symptoms: rhinorrhea, low-grade fever, cough, sore throat, headache, and wheezing. RSV is transmitted via large nasopharyngeal secretion droplets from infected individuals, close contact, or self-inoculation after touching contaminated surfaces.

Diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of Influenza A, Influenza B and RSV viruses.



3. Principle of the procedure

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit is designed for the diagnosis of Influenza A, Influenza B and/or RSV in respiratory samples. The detection is done in a one-step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of the specific targeted sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by amplification of a conserved region of the *M1* gene for *Flu A* and *Flu B* and a conserved region of the *N* gene for RSV using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence can be measured on BD MAX™ System.

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit contains in each tube all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Influenza A RNA targets are amplified and detected in channel 475/520, Influenza B RNA in channel 585/630, RSV RNA in channel 630/665 and the internal control (IC) in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-ABR212R	<i>Flu A</i> , <i>Flu B</i> & RSV reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent Red foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB05	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Purple foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-ABR124.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit.

- Real Time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional in vitro diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. 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.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.



8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit has been validated on throat swabs that were obtained by flexible nasopharyngeal nylon flocked swabs, immediately placed in viral transport medium (Viracell, Spain). Additional respiratory specimens from symptomatic patients could be tested according to the literature (i.e. nasal/deep nasal/nasopharyngeal swabs, combined nasal and throat swab, nasopharyngeal/nasal/tracheal aspirates, nasopharyngeal/nasal/throat washes, bronchoalveolar lavage (BALs), sputum), but must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens must be transported following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other specimens may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette 200-400 μL of respiratory clinical specimen into a BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute.
2. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

8.3.1. Creating PCR test programme for VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Flu A, Flu B & RSV*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".



- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 μ L.
 - a. Example: If pipette 200 μ L of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 μ L.
 - b. Note: maximum setting is 950 μ L.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	Flu A	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	300	0	40
585/630 (ROX)	Flu B	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 2. PCR settings.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

		False Receiving Channel				
Excitation Channel	Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	2.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	4.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Table 4. PCR protocol.

- 11) Click the "Save Test" button.



8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each specimen to be tested, remove one Unitized Reagent Strips (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV reaction tubes (red foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry on a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.
- i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (purple foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to carry out a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

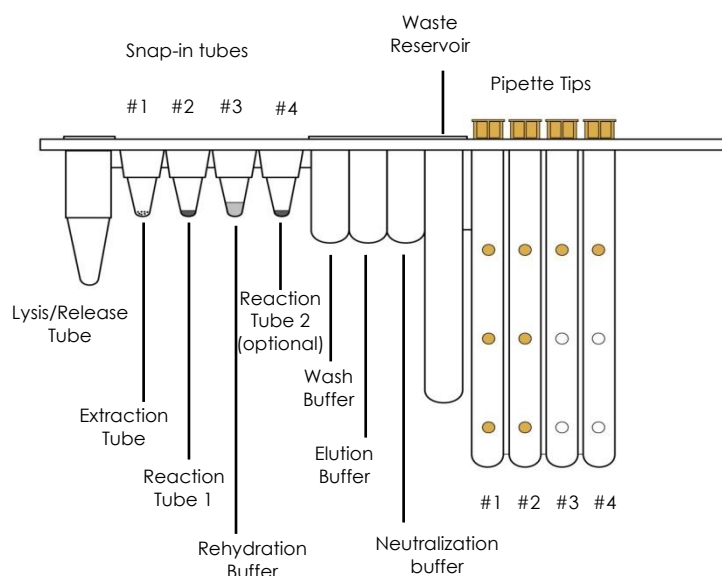


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID into Accession window of the Worklist (if applicable) and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4 BD MAX™ Report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen

9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each specimen tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 4). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 5.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Using the following table read and analyze the results:



Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	-	-	+	Flu A, Flu B and RSV Negative
+	+	+	+/-	Flu A, Flu B and RSV Positive
+	-	-	+/-	Flu A Positive, Flu B and RSV Negative
+	+	-	+/-	Flu A and Flu B Positive, and RSV Negative
+	-	+	+/-	Flu A and RSV Positive, and Flu B Negative
-	+	-	+/-	Flu B Positive, Flu A and RSV Negative
-	+	+	+/-	Flu B and RSV Positive, Flu A Negative
-	-	+	+/-	RSV Positive, Flu A and Flu B Negative
UNR	UNR	UNR	UNR	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control might show or not an amplification signal, because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection of the IC is not necessary.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

In case of unresolved results, absence of internal control signal in negative sample we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with throat swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical samples 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 might be detected, but results may not be reproducible.



- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Flu A, Flu B and/or RSV, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The results obtained with VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit may be Unresolved due to the sample contains inhibitors after processing or incorrect rehydration of the lyophilized reaction mix tube, or be Indeterminate or Incomplete due to instrument failure, and require retesting.

11. Quality control

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit was tested using 344 respiratory specimens (throat swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

The results were as follows:

VIASURE Flu A, B & RSV Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	157	2*	159
	-	7*	178	185
	Total	164	180	344

Table 6. Comparative results for Flu A.

Positive percent agreement is >98% and negative percent agreement is >96%.

*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	99	4*	103
	-	1*	240	241
	Total	100	244	344

Table 7. Comparative results for Flu B.

Positive percent agreement is >96% and negative percent agreement is >99%.

*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.



VIASURE <i>Flu A, Flu B & RSV</i> Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	22	4*	26
	-	3*	315	318
	Total	25	319	344

Table 8. Comparative results for RSV.

Positive percent agreement is >84% and negative percent agreement is >99%.

*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Influenza A, Influenza B and/or RSV viruses using VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit.

12.1. Analytical sensitivity

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for Flu A, Flu B and RSV with a positive rate of $\geq 95\%$ (Figure 2, 3 and 4).

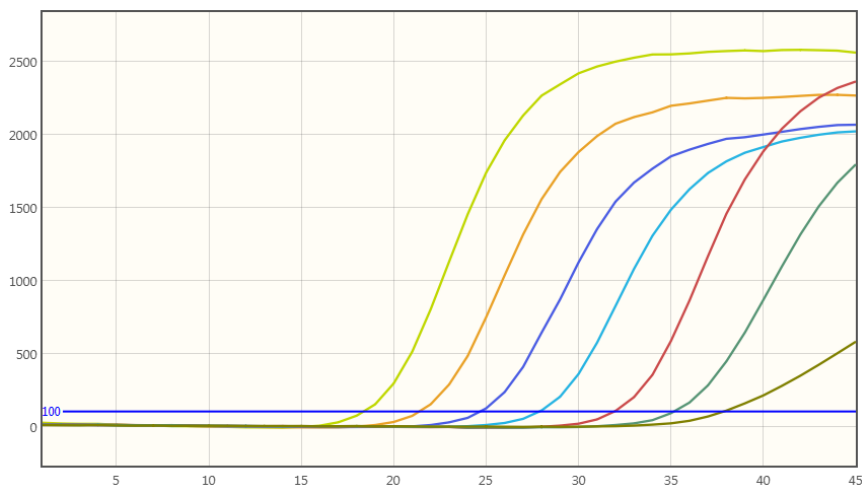
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^4 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

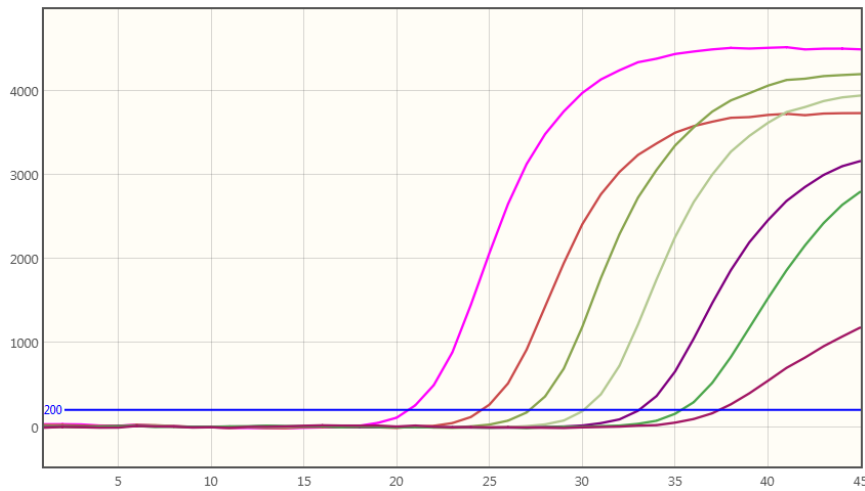
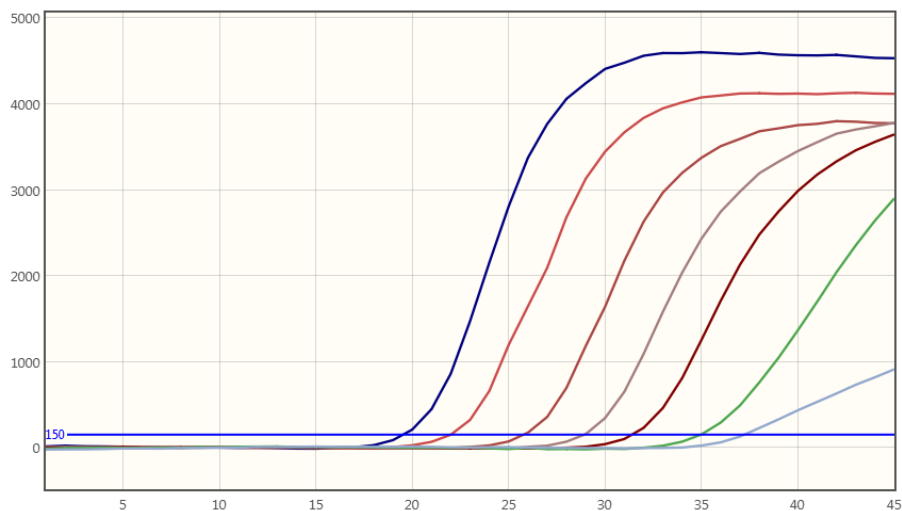


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.2. Analytical specificity

The specificity of the Flu A, Flu B and RSV assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:



Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Florida/04/06 virus	-/+
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Enterovirus Echovirus types 11 and 30	-	A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Human metapneumovirus A and B	-	A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV)	-/+
Human coronavirus 229E	-	A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.3. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit for *Flu A* was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus



(clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) and A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection kit for Flu B was evaluated against strains: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 and B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016 showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection kit for RSV was evaluated against Human Respiratory Syncytial Virus (RSV A and B), showing positive results.



DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit dient der Identifizierung von und Differenzierung zwischen Influenza-A-Viren, Influenza-B-Viren und/oder humanen respiratorischen Synzytial-Viren (RSV) in respiratorischen Proben von Patienten mit Anzeichen für und Symptomen einer Atemwegsinfektion. Die bestimmungsgemäße Verwendung des Tests soll in Kombination mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren die Diagnostizierung von Infektionskrankheiten erleichtern, die durch Influenza-A-Viren, Influenza-B-Viren und/oder RSV hervorgerufen wurden. Dieser Test nutzt das System BD MAX™ zur Extraktion von RNA und zur anschließenden Echtzeit-RT-PCR mithilfe der mitgelieferten Reagenzien sowie der Universal- und Einmalreagenzien des Systems BD MAX™. Der Nachweis erfolgt durch spezifische Oligonukleotide und eine Sonde mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff und einer mit einem Quencherfarbstoff zur Identifizierung von Influenza-A-Viren, Influenza-B-Viren und RSV.

2. Einführung und Erklärung

Influenza-Viren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und sind für den Großteil der Virusinfektionen der unteren Atemwege verantwortlich. Influenza A und B sind weltweit bedeutsame Ursachen von Morbidität und Mortalität, wobei vor allem bei älteren und gefährdeten Personen das Risiko der Entwicklung von schwerwiegenden Erkrankungen und Komplikationen, wie einer Pneumonie, gegeben ist. Influenza-Patienten können unter einigen oder allen der nachstehend genannten Symptome leiden: Fieber oder fiebriges Gefühl/Schüttelfrost, Husten, Halsschmerzen, verstopfte oder laufende Nase, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit. Das Influenza-Virus kann von Person zu Person auf zwei unterschiedliche Weisen übertragen werden: durch die Luft (Tröpfchen und Aerosole, die beim Husten und Niesen entstehen) oder durch direkten bzw. indirekten Kontakt.

Das Genom der Influenza-A- und Influenza-B-Viren besteht aus acht einzelsträngigen RNA-Segmenten, welche 11 bzw. 12 Virusproteine verschlüsseln. Die Virushülle, die ein Produkt der Plasmamembran der Wirtszelle ist, besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche Transmembranproteine, wie Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), sowie ferner die Matrixproteine M1 und M2 enthält. Influenza-A-Viren lassen sich in zwei Unterkategorien je nach der Antigenität ihrer „HA“- und „NA“-Moleküle unterteilen, während sich Influenza-B-Viren in zwei antigenetisch und genetisch unterschiedliche Linien - Victoria und Yamagata - unterteilen lassen.

Das humane respiratorische Synzytial-Virus (RSV) gehört der Familie der *Paramyxoviridae* an und es handelt sich dabei um die wichtigsten viralen Erreger akuter Atemwegsinfektionen. RSV ist ein behülltes Virus, dessen Genom aus einer nicht segmentierten, einzelsträngigen, linearen RNA mit negativer Polarität (ssRNA-) besteht. Das humane respiratorische Synzytial-Virus ist der vorrangige Erreger von Atemwegsinfektionen, wie Bronchitis, Pneumonie oder chronisch obstruktive Lungenerkrankung, wobei Personen einer breiten Altersgruppe vom Virus betroffen sein können. Die betroffenen Patienten leiden häufig unter einigen oder allen der nachstehend genannten Symptome: laufende Nase, leichtes Fieber, Husten, Halsschmerzen, Kopfschmerzen und Pfeifatmung.



RSV kann durch Nasensekrettröpfchen übertragen werden, die beim Husten oder Niesen freigesetzt werden. Diese Tröpfchen können daraufhin unmittelbar mit den Schleimhäuten der Augen, Nase und des Mundes in Berührung kommen oder mittelbar durch die Berührung von kontaminierten Oberflächen übertragen werden.

Die klinische Diagnose kann sich schwierig gestalten, da die Mehrzahl der Krankheitserreger von akuten Atemwegsinfektionen ähnliche Krankheitsbilder ergibt. Die Echtzeit-PCR-Methode ist das bevorzugte Diagnoseverfahren für Influenza A, Influenza B und RSV, da sich dieser Test als sehr sensitiv und spezifisch erwiesen hat.

3. Verfahren

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit dient der Diagnose von Influenza A, Influenza B und/oder RSV in respiratorischen Proben. Der Nachweis erfolgt durch Retrotranskription und anschließende Amplifikation der Zielsequenzen in Echtzeit, wobei beide Reaktionen im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Nach der Isolierung der RNA wird eine zur Zielsequenz komplementäre DNA durch Retrotranskriptase oder Reverse Transkriptase synthetisiert. Daraufhin wird das Influenza-A-Virus, Influenza-B-Virus bzw. RSV durch eine Polymerase-Kettenreaktion mithilfe von spezifischen Oligonukleotiden und einer Sonde mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff identifiziert, die mit einer konservierten Region des Gens *M1* im Fall von Influenza-A- und Influenza-B-Viren bzw. des Gens *N* im Fall von RSV hybridisieren.

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der Amplifikation der DNA hydrolysiert dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, sodass der Fluorophor vom Quencher abgespalten wird. Diese Reaktion führt zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals entsprechend der Menge von Ziel-RNA. Besagte Fluoreszenz lässt sich mit dem Medizinprodukt BD MAX™ messen.

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Reaktionsgefäß bereits alle Komponenten in stabiler Form, die zur Durchführung der Echtzeit-PCR benötigt werden (Primer/spezifische Sonden, dNTPS, Puffer, Polymerase, Retrotranskriptase), sowie eine interne Kontrolle, um eine Unterdrückung der Polymerase-Aktivität auszuschließen. Nach der Amplifikation lässt sich Influenza A im Kanal 475/520, Influenza B im Kanal 585/630, RSV im Kanal 630/665 und die interne Kontrolle (IK) im Kanal 530/565 nachweisen.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit enthält die in Tabelle 1 genannten Materialien und Reagenzien:

Referenznummer	Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
VS-ABR212R	Reaktionsgefäß für Influenza A, Influenza B und RSV	Eine Mischung aus Enzymen, Primer-Sonden, Puffer, dNTPs, Stabilisatoren und interne Kontrolle in stabiler Form	Transparent Rote Versiegelung	2 Beutel mit 12 Gefäßen
VS-RB05	Gefäß mit Rehydratationspuffer	Lösung zur Wiederherstellung des stabilen Produkts	Transparent Violette Versiegelung	1 Beutel mit 24 Gefäßen

Tabelle 1. Reagenzien und Materialien, die im Lieferumfang des Nachweiskits VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit mit der Referenznummer VS-ABR124 enthalten sind.



5. Reagenzien und Ausrüstung, die erforderlich sind, aber nicht mitgeliefert werden

Die nachstehende Liste schlüsselt die Materialien, die für die Durchführung des Tests benötigt werden, welche jedoch nicht im Lieferumfang des Nachweiskits VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit enthalten sind, auf.

- Echtzeit-PCR-Gerät: System BD MAX™
- Extraktionskit BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.: 442828)
- PCR-Karte für BD MAX™ (BD MAX™ PCR Cartridges) (Ref.: 437519)
- Vortexmischer
- Mikropipetten (zwischen 2 und 1000 µL)
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei Temperaturen zwischen 2 °C und 40 °C transportiert und aufbewahrt werden.
- Komponenten vor Lichteinstrahlung schützen.

7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- Für in-vitro-diagnostische Untersuchungen zum Gebrauch durch Fachpersonal.
- Das Kit nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Kontrollsiegel an der Außenverpackung aufgebrochen oder die Außenverpackung beschädigt ist.
- Die Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzkarton bereits bei Erhalt des Kits geöffnet oder beschädigt war.
- Die Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzhüllen oder Schutzbeutel der Gefäße bereits bei Erhalt des Kits geöffnet oder beschädigt waren.
- Die Reaktionsgefäße nicht verwenden, wenn das Trockenmittel, das jedem Aluminiumbeutel beigelegt ist, nicht enthalten oder beschädigt ist.
- Das Trockenmittel nicht aus den Aluminiumbeuteln entfernen, die Reaktionsgefäße enthalten.
- Die Aluminiumbeutel, die dem Schutz der Reaktionsgefäße dienen, mit dem Zippverschluss sofort nach jedem Gebrauch schließen. Überschüssige Luft vor dem Schließen der Beutel entfernen.
- Die Reaktionsgefäße nicht verwenden, wenn die Schutzfolie aus Aluminium aufgebrochen oder beschädigt ist.
- Die Reagenzien verschiedener Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit einer Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.



- Sollten andere PCR-Assays im selben Laborbereich durchgeführt werden, sicherstellen, dass der Test VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit, das Extraktionskit BD MAX™ ExK™ TNA-3 und alle sonstigen Reagenzien, die zusätzlich zur Durchführung des Tests benötigt werden, sowie das System BD MAX™ nicht kontaminiert sind. Handschuhe vor Handhabung der Reagenzien und der PCR-Karten (*Cartridges*) wechseln.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Es sollte im Extraktionsbereich begonnen werden und daraufhin sollte die Untersuchung im Amplifikations- und Nachweisbereich fortgesetzt werden. Die in einem Bereich verwendeten Proben, Ausrüstungsgegenstände und Reagenzien dürfen nicht mit dem Bereich in Berührung kommen, in dem der vorherige Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Nach Durchführung des Tests die Hände waschen.
- Die Proben müssen als potentiell infektiös behandelt werden. Dies gilt auch für die Reagenzien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind. Beide müssen im Einklang mit den nationalen Rechtsvorschriften über medizinische Abfälle gehandhabt werden. Bei der Entnahme, Lagerung, Handhabung und Entsorgung der Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen ergreifen.
- Wir empfehlen, häufig benutzte Ausrüstungsgegenstände, insbesondere Mikropipetten, und die Arbeitsflächen regelmäßig zu dekontaminieren und zu desinfizieren.
- Für weitere Informationen zu Warnhinweisen, Vorsichtsmaßnahmen und zusätzlichen Verfahren bitte das Benutzerhandbuch über das System BD MAX™ zu Rate ziehen.

8. Testverfahren

8.1. ENTNAHME, AUFBEWAHRUNG UND BEFÖRDERUNG DER PROBEN

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit ist für Rachenabstriche validiert, die mithilfe von flexiblen nasopharyngealen Abstrichtupfern aus Nylon genommen werden. Nach der Probenahme muss der Tupfer unverzüglich in das virale Transportmedium (Vircell, Spanien) eingesetzt werden. Gemäß der einschlägigen Fachliteratur können zusätzliche respiratorische Proben von symptomatischen Patienten (Nasenabstrich/tiefer Nasenabstrich/nasopharyngealer Abstrich, Kombination aus Nasen- und Rachenabstrich, nasopharyngeales Aspirat/Nasenaspirat/Rachenaspirat, nasopharyngeale/nasale/pharyngeale Spülflüssigkeit, bronchoalveoläre Lavage, Sputum) genommen werden, diese müssen jedoch vom Benutzer validiert werden.

Bei der Entnahme, Aufbewahrung und Beförderung der Proben sind die vom Benutzer validierten Verfahren zu beachten. Im Allgemeinen sind die respiratorischen Proben zu entnehmen und ordnungsgemäß auf den sauberen Behältern mit oder ohne Transportmedium (je nach Art der entnommenen Probe) zu kennzeichnen. Mit der Untersuchung der Proben sollte schnellstmöglich begonnen werden, um deren Qualität zu gewährleisten. Die Proben sind entsprechend den lokalen und nationalen Rechtsvorschriften über die Beförderung biologischer Proben zu transportieren. Für längere Transporte mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden empfehlen wir die Durchführung der Beförderung bei ≤ 20 °C. Die Proben können bis zu 24 Stunden bei Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C aufbewahrt werden oder alternativ bei -20 °C oder -70 °C eingefroren werden, sollten die Proben für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden müssen. Einfrier- und Auftauphasen sind zu vermeiden, um eine Zersetzung der Probe und der Nukleinsäuren zu verhindern.



8.2. PROBENVORBEREITUNG UND RNA-EXTRAKTION

Proben gemäß den Empfehlungen vorbereiten, die im Benutzerhandbuch des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-3 erscheinen. Es ist zu beachten, dass andere Arten von Proben unter Umständen zunächst aufbereitet werden müssen. Die Anwendung anderer spezieller Vorbereitungs- und Extraktionsverfahren muss vom Benutzer überprüft und validiert werden.

1. 200-400 µL der respiratorischen klinischen Probe in ein Probengefäß mit Puffer des Systems BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) pipettieren und das Gefäß mit dem Septumdeckel verschließen. Sicherstellen, dass es zu einer vollständigen Vermischung kommt, indem die Probe 1 Minute lang bei hoher Geschwindigkeit im Vortexmischer geschüttelt wird.
2. Mit Abschnitt „8.3 Funktionsweise des Systems BD MAX™“ fortfahren.

8.3. FUNKTIONSWEISE DES SYSTEMS BD MAX™

Hinweis: Für genauere Anweisungen bitte das Benutzerhandbuch des Systems BD MAX™ heranziehen.

8.3.1. Testprogramm für das Nachweiskit VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit erstellen

Hinweis: Wenn Sie bereits den Test für das VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit erstellt haben, können Sie diesen Schritt 8.3.1 überspringen und direkt zu Punkt 8.3.2 gehen.

- 1) Auf dem Bildschirm „Run“ des Systems BD MAX™ die Registerkarte „Test Editor“ auswählen.
- 2) Auf die Schaltfläche „Create“ klicken.
- 3) In das Feld „Test Name“ den Namen des Tests eingeben, z.B. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) Im Dropdown-Menü „Extraction Type“ „ExK TNA-3“ auswählen.
- 5) Im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ „Type 5“ auswählen.
 - a. Hinweis: Das Produkt kann gemeinsam mit anderen Produkten von Viasure, die mit BD MAX™ kompatibel sind, verwendet werden. In diesem Fall bitte „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ auswählen.
- 6) Im Menüpunkt „Sample extraction parameters“ „User defined“ auswählen und das Volumen auf den Volumenwert der klinischen Probe plus 550 µL einstellen.
 - a. Beispiel: Bei Pipettierung von 200 µL einer respiratorischen klinischen Probe in ein Probengefäß mit Puffer von BD MAX™ ExK™ TNA-3, ist der Wert auf 750 µL einzustellen.
 - b. Hinweis: Das maximale Volumen sind 950 µL.
- 7) Im Menüpunkt „Ct Calculation“ „Call Ct at Threshold Crossing“ auswählen.
- 8) In der Registerkarte „PCR Settings“ die folgenden Parameter eingeben: „Channel Settings“, „Gains“ und „Threshold“ (Tabelle 2).



- a. Hinweis: Das Produkt kann gemeinsam mit anderen Produkten von Viasure verwendet werden, die mit BD MAX™ kompatibel sind. In diesem Fall „PCR Settings“ und „Test Steps“ für beide Positionen - 2 (grün) und 4 (blau) - vervollständigen.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	Flu A	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	300	0	40
585/630 (ROX)	Flu B	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 2. PCR Settings

- 9) In der Registerkarte „PCR Settings“ sind außerdem die Parameter „Spectral Cross Talk“ (Tabelle 3) einzugeben.

		False Receiving Channel				
Excitation Channel	Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	2.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	4.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Tabelle 3. Parameter „Spectral Cross Talk“

- 10) In der Registerkarte „Test Steps“ das PCR-Protokoll angeben (Tabelle 4).

Phase	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabelle 4. PCR-Protokoll

- 11) Auf die Schaltfläche „Save Test“ klicken.

8.3.2. Vorbereitung des Probengestells des Systems BD MAX™

- Für jede Probe einen gesonderten Teststreifen mit Reagenzien (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) vom Extraktionskit (BD MAX™ ExK TNA-3 Kit) verwenden. Jeden Streifen behutsam gegen eine harte Oberfläche klopfen, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Gefäße sammeln, und den Streifen mit Reagenzien in das Probengestell des Systems BD MAX™ einsetzen.
- Die Anzahl der benötigten Extraktionsgefäße (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (weißes Siegel)) bestimmen und aus dem Schutzbeutel nehmen. Das Extraktionsgefäß (weißes Siegel) ordnungsgemäß auf der entsprechenden Position auf dem TNA-Streifen mit Reagenzien einsetzen (Position 1. Weißer Farbcode auf dem Probengestell. Siehe Abbildung 1). Überschüssige Luft entfernen und die Schutzbeutel mit dem Zippverschluss verschließen.



- 3) Die benötigte Anzahl von Reaktionsgefäßen des Tests VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit (rotes Siegel) ermitteln und herausnehmen. Die Reaktionsgefäße daraufhin auf ihrer jeweiligen Position auf dem Streifen einsetzen (Position 2. Grüner Farbcode auf dem Probengestell. Siehe Abbildung
 - a. Überschüssige Luft entfernen und die Schutzbeutel aus Aluminium mit dem Zippverschluss verschließen.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.
 - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ ausgewählt haben (Abschnitt 8.3.1), die benötigte Anzahl von zusätzlichen Reaktionsgefäßen des Tests VIASURE (Siegel in anderer Farbe) ermitteln und sie auf der jeweiligen Position auf dem Streifen einsetzen (Position 4. Blauer Farbcode auf dem Probengestell. Siehe Abbildung 1). Überschüssige Luft entfernen und die Schutzbeutel aus Aluminium mit dem Zippverschluss verschließen.
- 4) Die benötigte Anzahl von Gefäßen mit Rehydratationspuffer (violetttes Siegel) entnehmen und in der jeweiligen Position auf dem Streifen einsetzen (Position 3. Ohne Farbcode auf dem Probengestell. Siehe Abbildung 1). Überschüssige Luft entfernen und die Beutel mit dem Zippverschluss verschließen.
 - a. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Überführung bitte sicher, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.

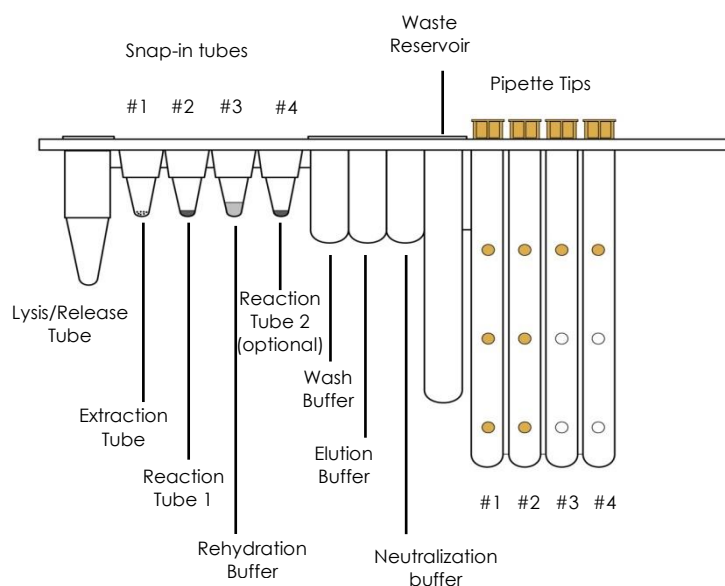


Abbildung 1. Teststreifen mit den jeweiligen Reagenzien (BD MAX™ TNA Reagent (TNA)) vom Extraktionskit BD MAX™ ExK TNA-3 Kit

8.3.3. Konfiguration des Systems BD MAX™

- 1) Bei Gebrauch der Software v4.50A des Systems BD MAX™ oder einer neueren Version die Registerkarte „Work List“ auf dem Bildschirm „Run“ auswählen.
- 2) Im Dropdown-Menü „Test“ VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* auswählen (falls dieses Testprogramm noch nicht erstellt wurde, zunächst die Schritte in Punkt 8.3.1 dieses Handbuchs befolgen).



- 3) Im Dropdown-Menü die Chargennummer des verwendeten Extraktionskits (erscheint auf der Außenverpackung) auswählen. Dieser Schritt ist optional.
- 4) Die Identifikationsnummer/Den Strichcode des Probengefäßes mit Puffer von BD MAX™ ExK TNA-3 in das Feld „Sample Tube“ der Registerkarte „Work List“ eingeben, indem Sie den Strichcode mit einem Scanner einscannen oder manuell eingeben.
- 5) Die Kennnummer der Probe/Identifikationsnummer des Patienten in das Feld „Accession“ der Registerkarte „Work List“ (falls zutreffend) eingeben und auf die Schaltfläche „Save“ klicken. Fortfahren, bis alle Probengefäße mit dem Puffer eingeführt sind. Sicherstellen, dass die Kennzeichnung der Probe/Identifikationsnummer des Patienten und die Probengefäße mit Puffer korrekt aufeinander abgestimmt sind.
- 6) Den vorbereiteten Probenpuffer in das/die Gestell/e des Systems BD MAX™ einsetzen.
- 7) Das/Die Gestell/e in das System BD MAX™ einsetzen (das Gestell A befindet sich auf der linken Seite des Systems BD MAX™ und das Gestell B auf der rechten Seite).
- 8) Die erforderliche Anzahl von PCR-Karten von BD MAX™ in das System einsetzen.
- 9) Die Öffnung des Systems BD MAX™ schließen.
- 10) Auf „Start Run“ drücken, um mit dem Verfahren zu beginnen.

8.3.4 Von BD MAX™ generierter Bericht

- 1) Im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ klicken.
- 2) Die in der Assay-Liste aufgeführte Probe durch einen Doppelklick öffnen oder die Probe auswählen und auf die Schaltfläche „View“ klicken.
- 3) Auf die Schaltfläche „Print“ klicken und Folgendes auswählen: „Run Details, Test Details and Plot...“.
- 4) Beim Bildschirm „Run Report“ auf die Schaltfläche „Print or Export“ klicken.

9. Ergebnisinterpretation

Für eine detaillierte Beschreibung zur Auswertung der Daten bitte das Benutzerhandbuch des Systems BD MAX™ heranziehen.

Die Datenauswertung erfolgt mithilfe der Software des Systems BD MAX™ im Einklang mit den Anweisungen des Herstellers. Die Software des Systems BD MAX™ ermittelt die Ct-Werte und zeigt die Amplifikationskurven für jeden einzelnen der Nachweiskanäle jeder Probe an, was folgendermaßen auszuwerten ist:

- Ein Ct-Wert von 0 deutet darauf hin, dass die Software keinen Ct-Wert mit dem festgelegten Grenzwert ermitteln konnte (siehe Tabelle 2). Wenn die Amplifikationskurve ebenso wie der Ct-Wert „0“ ergibt, muss die Auswertung manuell vorgenommen werden.
- Ein Ct-Wert von „-1“ zeigt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.
- Alle anderen Ct-Werte sind in Korrelation mit der Amplifikationskurve und gemäß den in Tabelle 5 beschriebenen Interpretationsrichtlinien zu interpretieren.



Das Signal der internen Kontrolle überprüfen, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Außerdem überprüfen, dass es zu keiner Fehlermeldung des Systems BD MAX™ gekommen ist.

Mithilfe der folgenden Tabelle die Ergebnisse ablesen und analysieren:

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	-	-	+	Flu A, Flu B and RSV Negative
+	+	+	+/-	Flu A, Flu B and RSV Positive
+	-	-	+/-	Flu A Positive, Flu B and RSV Negative
+	+	-	+/-	Flu A and Flu B Positive, and RSV Negative
+	-	+	+/-	Flu A and RSV Positive, and Flu B Negative
-	+	-	+/-	Flu B Positive, Flu A and RSV Negative
-	+	+	+/-	Flu B and RSV Positive, Flu A Negative
-	-	+	+/-	RSV Positive, Flu A and Flu B Negative
UNR	UNR	UNR	UNR	Ungelöstes Testergebnis (UNR) aufgrund der Präsenz von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten.
IND	IND	IND	IND	Nicht bestimmbares Testergebnis (IND). Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	INC	Unvollständiges Testergebnis (INC). Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 5. Auswertung

+: Amplifikationskurve

-: ohne Amplifikationskurve

Eine Probe ist positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt und die interne Kontrolle eine Amplifikationsgrafik zeigt oder nicht zeigt. Gelegentlich ist der interne Kontrollnachweis nicht notwendig, da die Präsenz einer anfänglich hohen Kopienzahl der Zielnukleinsäure zu einer präferenziellen Amplifikation jener führen kann.

Eine Probe ist negativ, wenn keine Amplifikationskurve über dem Grenzwert nachgewiesen werden kann und die interne Kontrolle sehr wohl eine solche aufweist. Eine Unterdrückung der PCR-Reaktion kann aufgrund der Amplifikation bei der internen Kontrolle ausgeschlossen werden.

Bei einem Ausbleiben des internen Kontrollsignals in den Probengefäßen wird die Wiederholung des Tests empfohlen. Verdünnen Sie hierzu die Probe im Verhältnis 1:10 oder wiederholen Sie die Extraktion, um Probleme im Hinblick auf eine mögliche Unterdrückung auszuschließen.

10. Grenzen des Tests



- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, wenngleich er bisher nur für Rachenabstriche validiert ist.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die RNA muss ordnungsgemäß aus den respiratorischen Proben extrahiert werden. Eine nicht ordnungsgemäß durchgeführte Entnahme, Aufbewahrung und/oder Beförderung von Proben kann zu falschen negativen Ergebnissen führen.
- Es kann eine extrem niedrige Kopienzahl der Zielform unterhalb des nachweisbaren Grenzwerts nachgewiesen werden, allerdings können die Ergebnisse unter Umständen nicht wiederholbar sein.
- Es besteht die Möglichkeit von falschen positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit Influenza A, Influenza B und/oder RSV. Dazu kann es durch Proben kommen, die hohe Konzentrationen der Ziel-RNA-Form enthalten, oder aufgrund einer Verschleppung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Beim VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit kann es aufgrund von Hemmsubstanzen in der Probe oder einer inkorrekten Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes zu einem ungelösten Ergebnis oder aufgrund eines Gerätefehlers zu einem nicht bestimmbar bzw. unvollständigen Ergebnis kommen. In einem solchen Fall ist eine erneute Durchführung des Tests erforderlich.

11. Qualitätskontrolle

Das Nachweiskit VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Reaktionsgefäß eine interne Kontrolle (IK), welche die korrekte Funktionsweise des Verfahrens bestätigt.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Sensitivität und Spezifität

Es wurden 344 respiratorische Proben (Rachenabstriche) von symptomatischen Patienten mithilfe des VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit untersucht. Die Ergebnisse wurden mit jenen verglichen, die durch ein molekulares Nachweisverfahren (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)) erhalten wurden.

Die Ergebnisse fielen folgendermaßen aus:

VIASURE <i>Flu A, B & RSV</i> Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	157	2*	159
	-	7*	178	185
	Total	164	180	344

Tabelle 6. Vergleichende Bewertung der Ergebnisse für Influenza A.

Die prozentuelle Übereinstimmung bei positiven Ergebnissen liegt bei >98%, während sie für negative Ergebnisse bei >96% liegt.

* Die geringe Menge der in den Proben nachgewiesenen RNA-Form liegt unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode.



VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	99	4*	103
	-	1*	240	241
	Total	100	244	344

Tabelle 7. Vergleichende Bewertung der Ergebnisse für Influenza B.

Die prozentuelle Übereinstimmung bei positiven Ergebnissen liegt bei >96%, während sie für negative Ergebnisse bei >99% liegt

* Die geringe Menge der in den Proben nachgewiesenen RNA-Form liegt unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode.

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	22	4*	26
	-	3*	315	318
	Total	25	319	344

Tabelle 8. Vergleichende Bewertung der Ergebnisse für RSV.

Die prozentuelle Übereinstimmung bei positiven Ergebnissen liegt bei >84%, während sie für negative Ergebnisse bei >99% liegt

* Die geringe Menge der in den Proben nachgewiesenen RNA-Form liegt unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Influenza-A- und Influenza-B-Viren sowie RSV mithilfe des Nachweiskits VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze von VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit liegt bei ≥ 10 RNA-Kopien je Reaktion für Influenza A, Influenza B und RSV (Abbildungen 2, 3 und 4) mit einer Positiv-Rate von $\geq 95\%$.



Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines Influenza-A-Musters ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ Kopien/Reaktion). Versuch durchgeführt mit dem System BD MAX™ (Kanal 475/520 (FAM)).

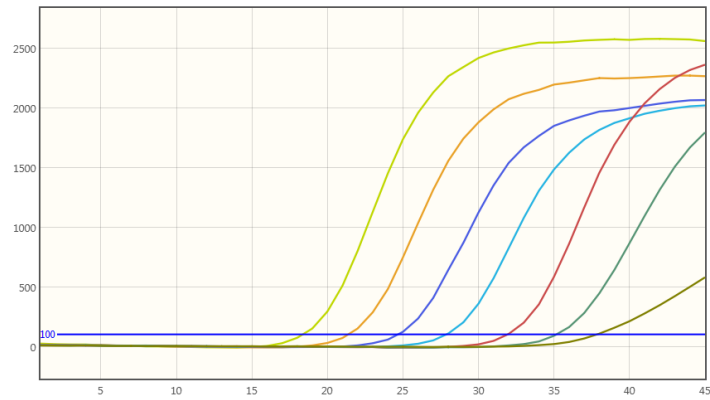


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines Influenza-B-Musters ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ Kopien/Reaktion). Versuch durchgeführt mit dem System BD MAX™ (Kanal 585/630 (ROX)).

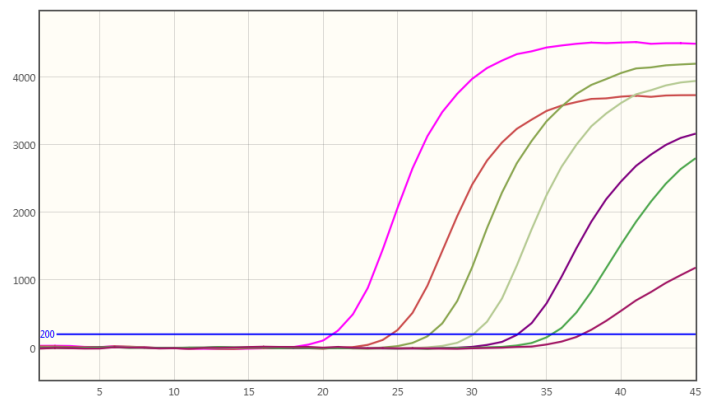
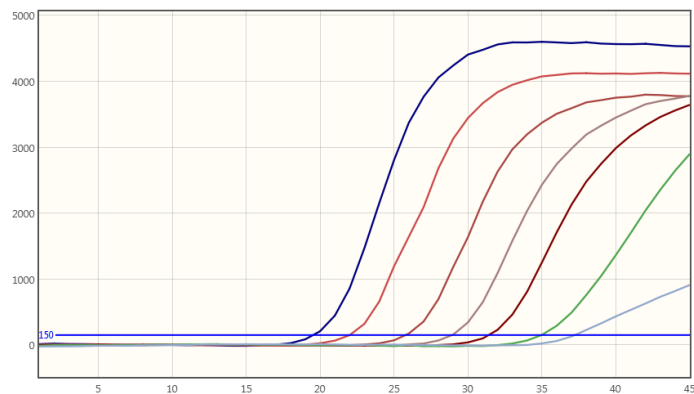


Abbildung 4. Verdünnungsreihe eines RSV-Musters ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^0$ Kopien/Reaktion). Versuch durchgeführt mit dem System BD MAX™ (Kanal 630/665 (Cy5)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des Tests auf Influenza A, Influenza B und RSV wurde durch Untersuchung einer repräsentativen Auswahl bestätigt, die aus verschiedenen. Es wurde keine Kreuzreaktivität zwischen einem der folgenden getesteten Mikroorganismen festgestellt, mit Ausnahme der Zielpathogene jedes Assays:

Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Florida/04/06 virus	-/+
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Enterovirus Echovirus types 11 and 30	-	A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Human metapneumovirus A and B	-	A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV)	-/+
Human coronavirus 229E	-	A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+		

Tabelle 11. Pathogene Referenz-Mikroorganismen, die bei dieser Untersuchung verwendet wurden.

12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit für Influenza A wurde auf die folgenden Stämme untersucht: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus,



A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) und A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, wobei das Ergebnis positiv ausfiel.

Die Reaktivität des VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit für Influenza B wurde auf die folgenden Stämme untersucht: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 and B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016), wobei das Ergebnis positiv ausfiel.

Die Reaktivität des VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit für RSV wurde im Hinblick auf das humane respiratorische Synzytial-Virus (RSV A und B) untersucht, wobei das Ergebnis positiv ausfiel.

13. Bibliography/Bibliografie

1. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
3. R.L. Kuo *et al.* Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
4. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Accessed 2015 Dec 30.
5. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
6. French, *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
7. X. Yu *et al.* Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
8. N. Mazur *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
9. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
10. A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
11. M. Hindiyeh *et al.* Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424.



14. Symbols for IVD components and reagents/Symbole für Reagenzien und Produkte zur In-vitro-Diagnose

	<i>In vitro</i> diagnostic device In-vitro-Diagnostikum		Keep dry Trocken lagern		Use by Verfallsdatum		Manufacturer Hersteller		Batch code Chargennummer
	Consult instructions for use Siehe Gebrauchsanweisung		Temperature limitation Temperaturbegrenzung		Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Tests		Sample diluent Probenverdünner		Catalogue number Referenznummer

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.







F-362 rev01



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cer-test.es



VIASURE online

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC