

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Manuel pour les références suivantes :

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

à utiliser avec 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:

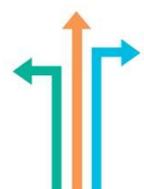
Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-ABR212R	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent Red foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB05	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute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



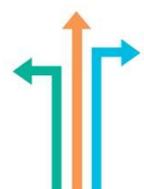
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

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.

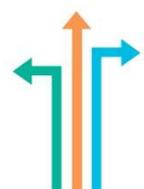
8.3. PCR PROTOCOL

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 µL.
 - a. Example: If pipette 200 µL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 µL.
 - b. Note: maximum setting is 950 µL.
- 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					
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	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.

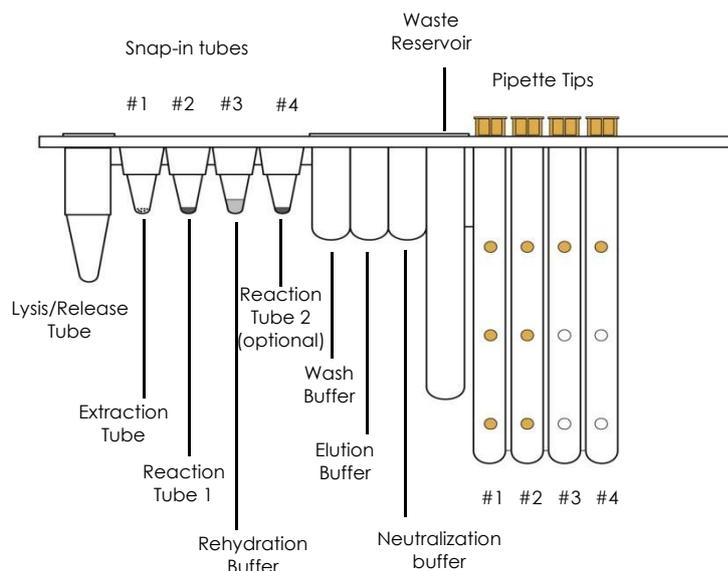
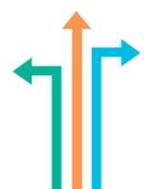


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



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

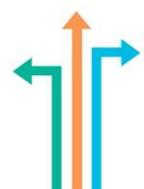
For a detailed description on how to analyze data, refer to BD MAX™ System User's manual.

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

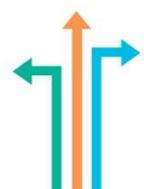
A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control might show or not an amplification signal, because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection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

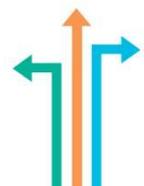
*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

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 (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

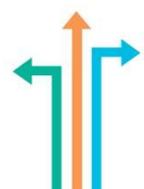
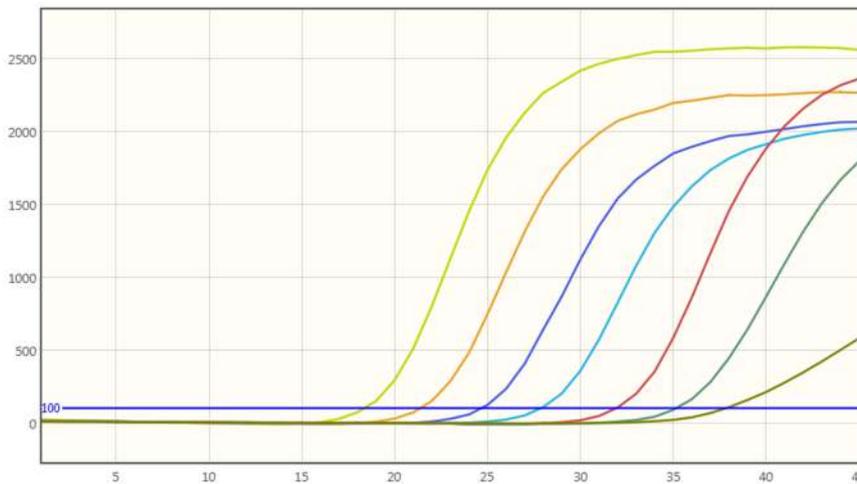


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

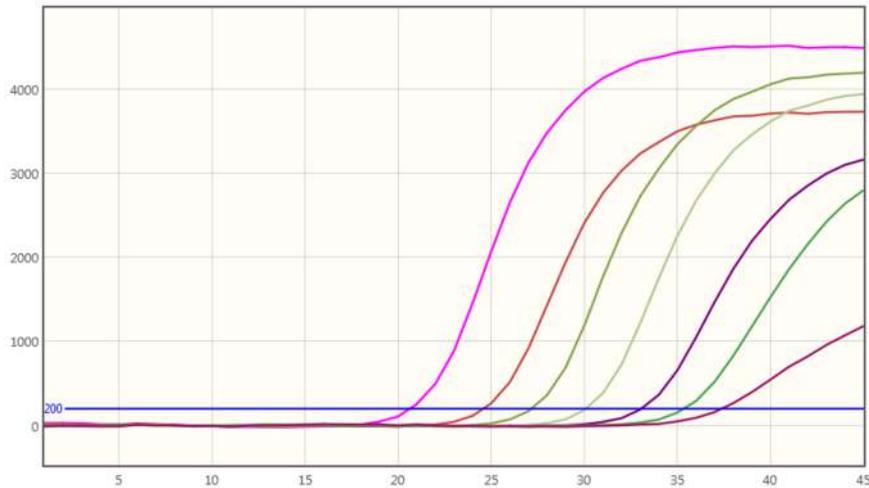
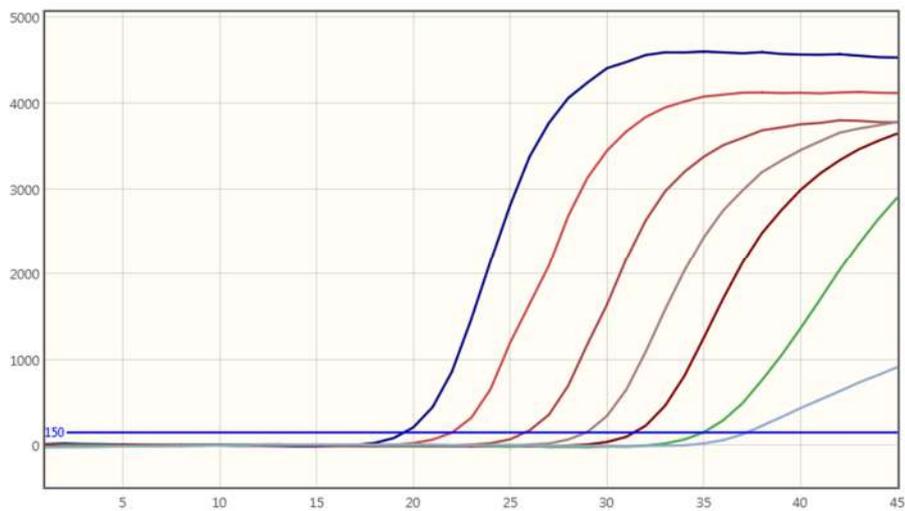


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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

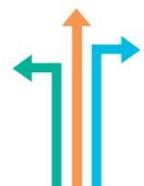
The reactivity of VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit for Flu A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (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.



FRANÇAIS

1. Application prévue

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit est conçu pour l'identification et la différenciation spécifique des virus de la grippe influenza A et influenza B ou du virus respiratoire syncytial (VRS) humain dans des échantillons respiratoires de patients présentant des signes et symptômes d'infection respiratoire. L'application prévue du test consiste à faciliter le diagnostic d'infection par les virus influenza A et influenza B ou le VRS en combinaison avec des facteurs de risques cliniques et épidémiologiques. Ce test est effectué avec le système BD MAX™ pour procéder à l'extraction de l'ARN et la PCR subséquente en temps réel en utilisant des réactifs fournis avec les réactifs universels et jetables du système BD MAX™. La détection est effectuée à l'aide d'oligonucléotides spécifiques et d'une sonde marquée avec une molécule fluorescente et une autre désactivatrice (*quencher*) pour détecter les virus influenza A, influenza B et le RSV.

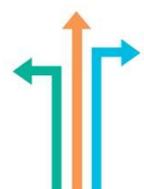
2. Introduction et explication

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont responsables de la plupart des infections virales des voies respiratoires inférieures. Les virus influenza de type A et B sont une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde, étant donné que les personnes âgées et les personnes en danger sont particulièrement exposées au risque de développer des maladies graves et des complications telles que la pneumonie. Les personnes atteintes de la grippe ressentent certains ou tous les symptômes suivants : fièvre ou sensation fébrile/frissons, toux, mal de gorge, congestion et écoulement nasal, myalgie, maux de tête et anorexie. Le virus de la grippe peut se transmettre d'une personne à l'autre de deux façons différentes : par voie aérienne (gouttes et aérosols se produisant en toussant et en éternuant) et par contact direct ou indirect.

Le génome des virus influenza A et B est constitué de huit segments d'ARN monocaténaire codant pour 11 ou 12 protéines virales. L'enveloppe virale, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte, se compose d'une bicouche lipidique contenant des protéines transmembranaires, telles que l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), ainsi que des protéines matricielles M1 et M2. Le virus influenza de type A est classé en sous-types fondés sur l'antigénicité de ses molécules « HA » et « NA », tandis que le virus influenza de type B est divisé en deux lignages antigéniques et génétiquement différents : le lignage Victoria et le lignage Yamagata.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) humain appartient à la famille des *Paramyxoviridae* et c'est l'agent causal viral le plus important des infections respiratoires aiguës. Le VRS est un virus enveloppé dont le génome consiste en un ARN monocaténaire linéaire non segmenté de polarité négative (ssRNA-). Le VRS humain est le principal agent responsable d'infections respiratoires telles que la bronchite, la pneumonie et la maladie pulmonaire obstructive chronique, et il peut toucher l'ensemble de la population à des âges très variés. Les patients touchés présentent souvent certains ou tous les symptômes suivants : rhinorrhée, fièvre légère, toux, mal de gorge, maux de tête et respiration sifflante.

Le VRS peut être transmis par des gouttelettes de sécrétions nasales qui sont expulsées en toussant ou en éternuant. Ces gouttes entrent en contact direct avec les muqueuses des yeux, du nez et de la bouche ou par auto-inoculation après avoir touché des surfaces contaminées.



Le diagnostic clinique peut être problématique, car un grand nombre d'agents pathogènes responsables d'infections respiratoires aiguës entraînent des tableaux cliniques semblables. La PCR en temps réel est la méthode de diagnostic des infections dues aux virus influenza A, influenza B et au VRS utilisée de préférence comme l'un des outils de diagnostic les plus sensibles et spécifiques.

3. Procédure

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit est conçu pour le diagnostic des infections dues aux virus influenza A, influenza B ou au VRS dans des échantillons respiratoires. La détection s'effectue par la rétrotranscription et l'amplification ultérieure en temps réel de la séquence cible, ce qui fait que les deux réactions se produisent dans le même puits. Après isolement de l'ARN, l'ADN complémentaire de la séquence cible est synthétisé par rétrotranscriptase, ou transcriptase inverse. Par la suite, l'identification des virus influenza A, influenza B et du VRS est effectuée au moyen de la réaction d'amplification en chaîne par polymérase à l'aide d'oligonucléotides spécifiques et d'une sonde marquée par fluorescence qui s'hybrident avec une région cible préservée du gène *M1* pour les virus influenza A et influenza B et du gène *N* pour le VRS.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit tire parti de l'activité 5' exonucléase de l'ADN-polymérase. Au cours de l'amplification de l'ADN, cette enzyme hydrolyse la sonde liée à la séquence d'ADN complémentaire en séparant le fluorophore du désactivateur. Cette réaction génère une augmentation du signal fluorescent proportionnelle à la quantité d'ARN cible. Cette fluorescence peut être surveillée dans l'équipement BD MAX™.

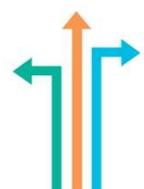
VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit contient dans chaque puits tous les composants nécessaires à la réalisation de la PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTP, tampon, polymérase, rétrotranscriptase) dans un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne pour exclure l'inhibition de l'activité polymérase. Après la réaction d'amplification, le virus influenza A est détecté dans le canal 475/520, le virus influenza B est détecté dans le canal 585/630, le VRS est détecté dans le canal 630/665 et le contrôle interne (CI) est détecté dans le canal 530/565.

4. Réactifs fournis

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit comprend le matériel et les réactifs énumérés dans le tableau 1 :

Référence	Réactif/Matériel	Description	Couleur	Quantité
VS-ABR212R	<i>Flu A, FluB & RSV</i> reaction tube	Un mélange d'enzymes, des amorces-sondes, un tampon, des dNTP, des stabilisants et un contrôle interne dans un format stabilisé	Transparent Scellé rouge	2 sachets de 12 tubes
VS-RB05	Rehydration Buffer tube	Solution pour la reconstitution du produit stabilisé	Transparent Scellé violet	1 sachets de 24 tubes

Tableau 1. Réactifs et matériel fournis dans le VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit sous la réf. VS-ABR124.



5. Réactifs et équipements requis mais non fournis

La liste suivante comprend le matériel nécessaire à l'utilisation mais non inclus dans le VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit.

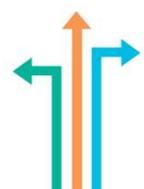
- Équipement de PCR en temps réel : BD MAX™ System.
- Trousse d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 (réf. : 442828)
- Cartouches PCR BD MAX™ (BD MAX™ PCR Cartridges) (réf. : 437519)
- Vortex.
- Micropipettes (entre 2 et 1000 µL).
- Embouts à filtre.
- Gants jetables non poudrés.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les trousse peuvent être transportées et stockées à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Protéger les composants de la lumière.

7. Précautions d'emploi pour l'utilisateur

- Destiné à un usage professionnel pour le diagnostic in vitro.
- Il est déconseillé d'utiliser la trousse après la date de péremption.
- Ne pas utiliser la trousse si le scellé d'effraction sur la boîte extérieure est brisé ou endommagé.
- Ne pas utiliser les réactifs si le boîtier extérieur est ouvert ou endommagé à leur arrivée.
- Ne pas utiliser les réactifs si les sachets ou les poches qui protègent les tubes sont ouverts ou endommagés à leur arrivée.
- Ne pas utiliser les tubes de réaction si le dessiccant inclus dans chaque sachet en aluminium n'y est pas ou est endommagé.
- Ne pas retirer le dessiccant des sachets en aluminium contenant les tubes de réaction.
- Après chaque utilisation, refermer immédiatement avec la fermeture à glissière les sachets en aluminium qui protègent les tubes de réaction. Retirer l'air des sachets avant de les refermer.
- Ne pas utiliser les tubes de réactifs si le protecteur en aluminium est brisé ou endommagé.
- Ne pas mélanger de réactifs provenant de différents sachets ou trousse ou lots.
- Protéger les réactifs de l'humidité. Une exposition prolongée à l'humidité peut compromettre les performances du produit.
- Dans le cas où d'autres tests PCR seraient effectués dans la même zone du laboratoire, veiller à ce que le test VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit, le kit d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA-3 et tout autre réactif supplémentaire nécessaire à la réalisation du test, ainsi que le système BD MAX™, ne sont pas contaminés. Les gants doivent être changés avant de manipuler les réactifs et les cartouches PCR.



- Concevoir un flux de travaux à sens unique. Commencer par la zone d'extraction, puis passer à la zone d'amplification et de détection. Éviter tout contact entre les échantillons, l'équipement et les réactifs utilisés dans une zone avec la zone où l'étape précédente a été réalisée.
- Suivre les bonnes pratiques de laboratoire. Porter des vêtements de protection, des gants jetables, des lunettes de protection et un masque. Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone de travail. Se laver les mains une fois le test terminé.
- Les échantillons, ainsi que les réactifs qui ont été en contact avec ceux-ci, doivent être traités comme s'ils étaient infectieux et gérés conformément à la législation nationale sur les déchets sanitaires. Prendre les précautions nécessaires pendant le prélèvement, le stockage, le traitement et l'élimination des échantillons.
- Une décontamination régulière des équipements couramment utilisés, en particulier des micropipettes, et des surfaces de travail est recommandée.
- Consulter le manuel d'utilisation du système BD MAX™ pour les avertissements, les précautions et les procédures supplémentaires.

8. Procédure de test

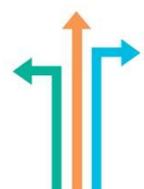
8.1. COLLECTE, STOCKAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit a été validé avec des échantillons de frottis du pharynx obtenus à l'aide d'écouvillons rhinopharyngés souples en nylon. L'échantillon a ensuite été immédiatement transféré dans le milieu de transport viral (Vircell, Espagne). Selon la littérature, d'autres échantillons respiratoires de patients symptomatiques pourraient être utilisés (frottis nasaux/nasaux profonds/rhinopharyngés, frottis nasaux et pharyngés combinés, aspirations rhinopharyngées/nasales/trachéales, lavages rhinopharyngés/nasaux/pharyngés, lavages broncho-alvéolaires, expectorations), mais devront être validés par l'utilisateur.

Pour le prélèvement, le stockage et le transport des échantillons, les conditions validées par l'utilisateur doivent être respectées. En général, les échantillons respiratoires doivent être correctement prélevés et étiquetés dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (en fonction du type d'échantillon), et traités le plus rapidement possible pour garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés conformément à la réglementation locale et nationale pour le transport des échantillons biologiques. Pour les longs transports de plus de 24 heures, il est recommandé d'expédier les échantillons à une température de ≤ -20 °C. Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 24 heures ou congelés à -20 °C ou -70 °C pour un stockage à long terme. Il convient d'éviter les cycles de congélation-décongélation afin de prévenir la dégradation de l'échantillon et les acides nucléiques.

8.2. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET EXTRACTION DE L'ARN

Effectuer la préparation des échantillons en suivant les recommandations qui figurent dans le mode d'emploi de la trousse d'extraction utilisée : BD MAX™ ExK™ TNA-3. Tenir compte du fait que d'autres échantillons peuvent nécessiter un prétraitement. L'utilisation d'autres procédures de préparation et d'extraction spécifiques doit être validée par l'utilisateur.



1. Pipetter 200 à 400 µL de l'échantillon clinique respiratoire dans un tube de tampon d'échantillons du système BD MAX™ (BD MAX™ ExK TNA-3 Sample Buffer Tube) et refermer le tube avec un bouchon à septum. Veiller à bien mélanger l'échantillon au vortex pendant une minute à grande vitesse.
2. Continuer avec la rubrique « 8.3.Fonctionnement du système BD MAX™ ».

8.3. FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME BD MAX™

Remarque : Veuillez consulter le manuel d'utilisation du système BD MAX™ pour obtenir des instructions plus détaillées.

8.3.1. Programmation du test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit

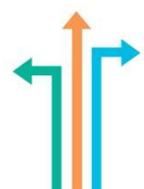
Remarque : Si vous avez déjà créé le test pour VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, vous pouvez sauter l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » du système BD MAX™, sélectionner l'onglet « Test Editor ».
- 2) Cliquer sur le bouton « Create ».
- 3) Dans la fenêtre « Test Name », écrire le nom du test : p. ex. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type », sélectionner « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format », choisir « Type 5 ».
 - a. Remarque : Le produit peut être utilisé conjointement avec d'autres produits Viasure pour BD MAX™ ; dans ce cas, sélectionner « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) ».
- 6) Dans « Sample extraction parameters », sélectionner « User defined » et ajuster le volume au volume de l'échantillon clinique plus 550 µL.
 - a. Exemple : Si 200 µL d'un échantillon clinique respiratoire sont pipetés dans un tube de tampon d'échantillon BD MAX™ ExK TNA-3, le paramètre doit être réglé sur 750 µL.
 - b. Remarque : Le volume maximal est 950 µL.
- 7) Dans « Ct Calculation », sélectionner « Call Ct at Threshold Crossing ».
- 8) Dans l'onglet « PCR settings », saisir les paramètres suivants : « Channel Settings », « Gains » et « Threshold » (tableau 2).
 - a. Remarque : Le produit peut être utilisé conjointement avec d'autres produits Viasure pour BD MAX™ ; dans ce cas, remplir « PCR Settings » et « Test Steps » pour les deux positions : 2 (vert) et 4 (bleu).

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

Tableau 2. PCR settings.

- 9) Dans l'onglet « PCR settings », saisir également les paramètres « Spectral Cross Talk » (tableau 3).



		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel	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	-

Tableau 3. Paramètres « Spectral cross-talk ».

10) Dans l'onglet « Test Steps », saisir le protocole de PCR (tableau 4).

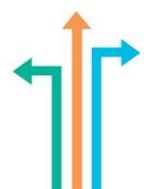
Étape	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tableau 4. PCR protocol.

11) Cliquer sur le bouton « Save Test ».

8.3.2. Préparation des portoirs du système BD MAX™

- 1) Pour chaque échantillon, placer une barrette réactive unitarisée (BD MAX™ TNA Reagent Strip [TNA]) de la trousse d'extraction (BD MAX™ ExK TNA-3 kit). Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que tous les liquides restent dans le fond des tubes et placer la barrette réactive dans le portoir du système BD MAX™.
- 2) Déterminer et séparer le nombre de tubes d'extraction nécessaires (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) [opercule blanc]) de leur sachet protecteur. Placer le tube d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante de la barrette réactive TNA (position 1. Code couleur blanc sur le portoir. Voir figure 1). Retirer l'air des sachets de protection et les refermer avec la fermeture éclair.
- 3) Calculer et séparer le nombre approprié de tubes de réaction du test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit (opercule rouge) et les placer dans la position correspondante de la barrette (position 2. Code couleur vert sur le portoir. Voir figure 1).
 - a. Retirer l'air des sachets d'aluminium et les refermer avec la fermeture éclair.
 - b. Pour une bonne réhydratation, assurez-vous que le produit lyophilisé se trouve dans la partie inférieure du tube et qu'il n'ait pas adhéré à la partie supérieure ou à la zone de scellement du tube.
 - i. Remarque : Si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (rubrique 8.3.1), calculez et séparez le nombre approprié de tubes de réaction des tests VIASURE supplémentaires (opercule de couleur différente) et les placer dans la position correspondante de la barrette (position 4. Code couleur bleu sur le portoir. Voir figure 1). Retirer l'air des sachets d'aluminium et les refermer avec la fermeture éclair.



- 4) Prendre le nombre nécessaire de tubes de tampon de réhydratation (opercule violet) et les placer dans la position correspondante de la barrette (position 3. Sans code couleur sur le portoir. Voir figure 1). Retirer l'air des sachets et les refermer avec la fermeture éclair.
 - a. Pour un bon transfert, assurez-vous que le liquide se trouve dans la partie inférieure du tube et qu'il n'ait pas adhéré à la partie supérieure ou de scellement du tube.

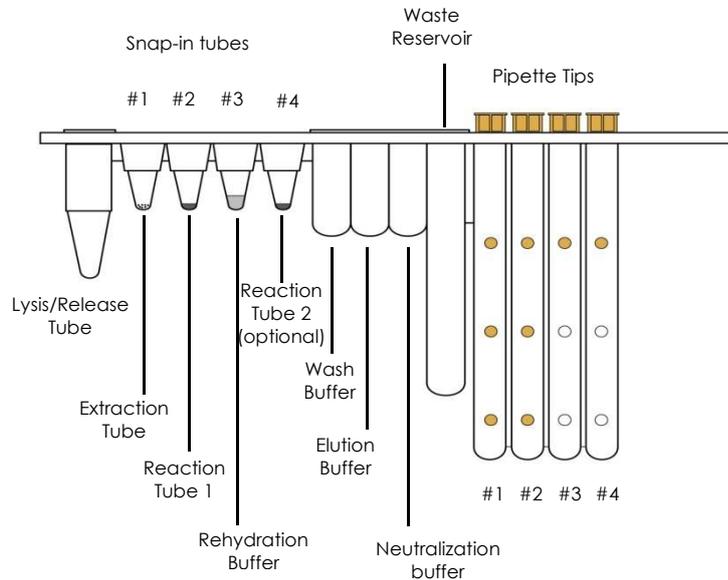
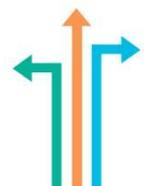


Figure 1. barrette réactive unitarisée (BD MAX™ TNA Reagent [TNA]) de la trousse d'extraction BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

8.3.3. Utilisation du système BD MAX™

- 1) Sélectionner l'onglet « Work List » sur l'écran « Run » en utilisant le logiciel v4.50A ou un supérieur du système BD MAX™.
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionner VIASURE Flu A, Flu B & RSV (s'il n'est pas encore créé, se reporter à la rubrique 8.3.1).
- 3) Sélectionner, dans le menu déroulant, le numéro de lot de la trousse d'extraction utilisée (situé sur le boîtier extérieur). Cette étape est facultative.
- 4) Saisir le numéro d'identification/le code-barres du tube de tampon d'échantillon BD MAX™ ExK TNA-3 dans la fenêtre de « Sample tube » sous l'onglet « Work list », soit en utilisant le lecteur de code barre, soit par saisie manuelle.
- 5) Saisir le numéro d'identification de l'échantillon/du patient dans la fenêtre « Accession » de l'onglet « Work list » (le cas échéant) et cliquer sur le bouton « Save ». Continuer jusqu'à ce que tous les tubes de tampon d'échantillon soient saisis. S'assurer que l'identification de l'échantillon/du patient et les tubes de tampon d'échantillon sont correctement appariés.
- 6) Placer le tampon d'échantillon préparé sur le(s) portoir(s) du système BD MAX™.
- 7) Placer le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™ (le portoir A se trouve du côté gauche du système BD MAX™ et le portoir B du côté droit).
- 8) Placer le nombre nécessaire de cartouches de PCR BD MAX™ dans le système BD MAX™.
- 9) Refermer la porte du système BD MAX™
- 10) Appuyer sur « Start Run » pour lancer la procédure.



8.3.4 Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquer sur le bouton « Results ».
- 2) Double cliquer sur le test inclus dans la liste des tests ou sélectionner le test et appuyer sur le bouton « view ».
- 3) Cliquer sur le bouton « Print » et sélectionner : « Run Details, Test Details and Plot... ».
- 4) Cliquer sur le bouton « Print or Export » de l'écran « Run Report ».

9. Interprétation des résultats

Pour une description plus détaillée sur la façon d'analyser les données, consulter le manuel d'utilisation du système BD MAX™.

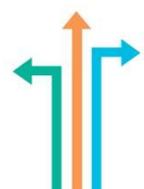
L'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel du système BD MAX™ conformément au mode d'emploi du fabricant. Le logiciel du système BD MAX™ fournit les valeurs de Ct et affiche les courbes d'amplification pour chacun des canaux de détection de chaque échantillon analysé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de 0 indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 2). Une courbe d'amplification affichant une valeur CT de « 0 » doit être examinée manuellement.
- Une valeur Ct de -1 indique qu'il n'y a pas eu d'amplification.
- Toutes les autres valeurs de CT doivent être interprétées en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les règles

d'interprétation énoncées dans le tableau 5.

Vérifier la sortie du signal du contrôle interne nécessaire au bon fonctionnement du mélange d'amplification. Vérifier également l'absence de défaillance du système BD MAX™.

Lire et analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :



Influenza A (475/520)	Influenza B (585/630)	VRS (630/665)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
-	-	-	+	Influenza A, influenza B et VRS négatifs
+	+	+	+/-	Influenza A, influenza B et VRS positifs
+	-	-	+/-	Influenza A positif, influenza B et VRS négatifs
+	+	-	+/-	Influenzas A et B positifs, et VRS négatif
+	-	+	+/-	Influenza A et VRS positifs, et influenza B négatif
-	+	-	+/-	Influenza B positif, influenza A et VRS négatifs
-	+	+	+/-	Influenza B et VRS positifs, et influenza A négatif
-	-	+	+/-	VRS positif, influenza A et B négatifs
UNR	UNR	UNR	UNR	Résultat non probant (UNR) : dû à la présence d'inhibiteurs dans la réaction de PCR ou dû à un problème général (non associé à un code d'erreur) pendant le processus de l'échantillon et/ou l'étape de l'amplification.
IND	IND	IND	IND	Résultat indéterminé (IND). Dû à une faille dans le système BD MAXTM. Ce résultat se produit en cas de faille de l'instrument associé à un code d'erreur.
INC	INC	INC	INC	Résultat d'essai incomplet (INC). Dû à une faille du système BD MAXTM. Ce résultat se produit en cas d'exécution incomplète de l'essai.

Tableau 5. Interprétation

+ : avec courbe d'amplification

- : sans courbe d'amplification

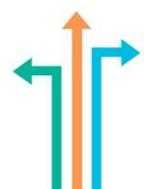
Un échantillon est considéré comme positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40 et si le contrôle interne affiche ou non un graphique d'amplification. Parfois, la détection du contrôle interne n'est pas nécessaire, car la présence d'un nombre initial élevé de copies de l'acide nucléique cible peut provoquer une amplification préférentielle de ce dernier.

Un échantillon est considéré comme négatif si une courbe d'amplification supérieure à la valeur seuil n'est pas détectée, mais qu'elle apparaît dans le contrôle interne. L'inhibition de la réaction PCR peut être exclue par l'amplification du contrôle interne.

En l'absence de signal de contrôle interne dans les puits d'échantillonnage, il est recommandé de répéter le test en diluant l'échantillon 1:10 ou de répéter l'extraction pour exclure tout problème d'inhibition éventuel.

10. Limitations du test

- Le résultat du test doit être évalué par un professionnel de la santé dans le contexte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests de diagnostic.
- Ce test pourrait être utilisé avec différents types d'échantillons, bien qu'il n'ait été validé qu'avec des échantillons de frottis du pharynx.



- Le bon fonctionnement du test dépend de la qualité de l'échantillon ; l'ARN doit être correctement extrait des échantillons respiratoires. Le prélèvement, le stockage ou le transport inadéquats des échantillons peuvent entraîner de faux négatifs.
- Un petit nombre de copies de la matrice cible peut être détecté en dessous de la limite de détection, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
- De faux positifs sont possibles en raison d'une contamination croisée avec la grippe A, la grippe B ou le VRS, soit par des échantillons contenant de fortes concentrations de matrice d'ARN cible, soit par une contamination par des produits de la PCR des réactions précédentes.
- Les résultats obtenus avec VIASURE *Flu A*, *Flu B* et *RSV* Real Time PCR Detection Kit peuvent être interprétés comme non probants à cause des inhibiteurs que l'échantillon contient après avoir été traité ou à cause d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange de réaction lyophilisée, ou ils peuvent être Indéterminés ou Incomplets dû à une faille de l'instrument ; il est donc nécessaire de refaire le test.

11. Contrôle de qualité

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit contient un contrôle interne (CI) dans chaque tube de réaction confirmant le bon fonctionnement de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité clinique

Quatre-vingt-onze échantillons respiratoires (frottis du pharynx) issus de patients symptomatiques ont été évalués à l'aide du VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par une méthode de détection moléculaire (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

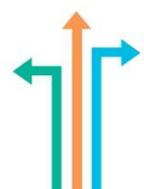
Les résultats ont été les suivants :

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

Tableau 6. Comparaison des résultats pour le virus influenza A.

Le pourcentage de concordance positive est > 98 % et le pourcentage de concordance négative est > 96 %.

* La faible quantité de matrice d'ARN détectée dans ces échantillons est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.



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	

Tableau 7. Comparaison des résultats pour le virus influenza B.

Le pourcentage de concordance positive est > 96 % et le pourcentage de concordance négative est > 99 %.

* La faible quantité de matrice d'ARN détectée dans ces échantillons est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.

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	

Tableau 8. Comparaison des résultats pour le VRS.

Le pourcentage de concordance positive est > 84 % et le pourcentage de concordance négative est > 99 %.

* La faible quantité de matrice d'ARN détectée dans ces échantillons est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.

Les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection des virus influenza A, influenza B et du RSV à l'aide du VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilité analytique

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit a une limite de détection de ≥ 10 copies d'ARN par réaction pour les virus influenza A, influenza B et le VRS (figures 2, 3 et 4) avec un taux d'acceptation de ≥ 95 %.

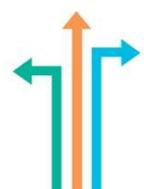


Figure 2. Dilutions en série d'un étalon de référence pour le virus influenza A ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ copies/réaction). Expérience réalisée sur l'équipement BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

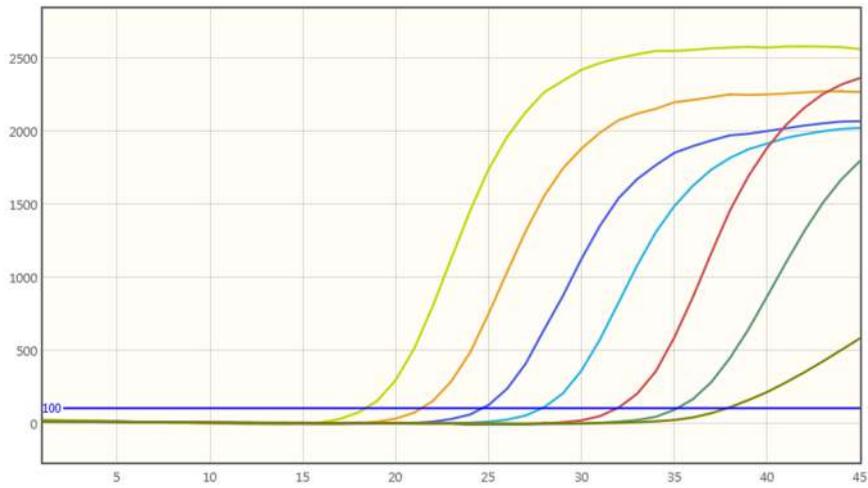


Figure 3. Dilutions en série d'un étalon de référence pour le virus influenza B ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ copies/réaction). Expérience réalisée sur l'équipement BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

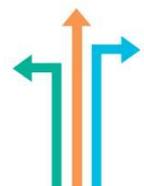
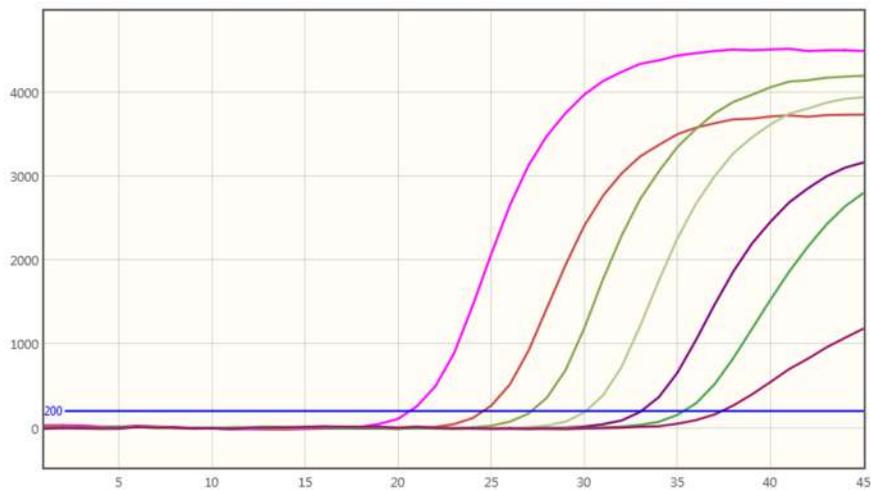
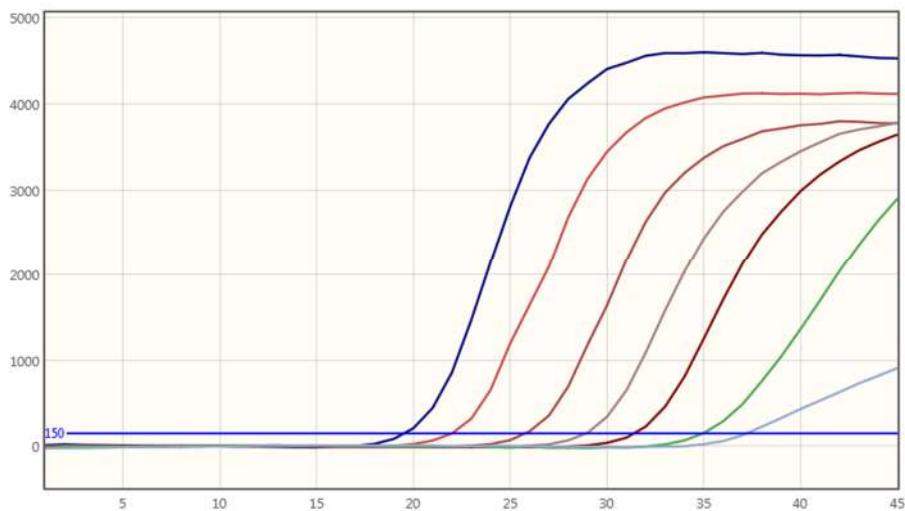


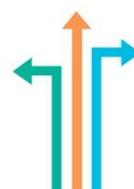
Figure 4. Dilutions en série d'un étalon de référence pour le VRS ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^0$ copies/réaction). Expérience réalisée sur l'équipement BD MAX™ System (canal 630/665 [Cy5]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test sur les virus influenza A, influenza B et le VRS a été confirmée en testant un panel de différents micro-organismes représentant les pathogènes respiratoires les plus courants.

Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes suivants, à l'exception des agents pathogènes ciblés de chaque test:

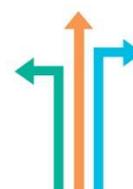


Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 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	-/+		

Tableau 9. Micro-organismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique

La réactivité de VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit pour le virus influenza A a été évaluée par rapport à la souche dérivée de la souche 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 et A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C),



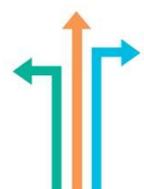
A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) and A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), et a donné un résultat positif.

La réactivité de VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit para le virus influenza B a été évaluée par rapport aux souches B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 et B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016), et a donné un résultat positif.

La réactivité de VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit pour RSV a été évaluée par rapport au virus respiratoire syncytial humain (RSVA et B), et a donné un résultat positif.

13. Bibliography/Bibliographie

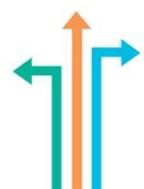
1. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
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.

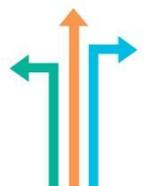


14. Symbols for IVD components and reagents/Symboles pour les réactifs et les produits destinés au diagnostic *in vitro*

	<p><i>In vitro</i> diagnostic device Produit destiné au diagnostic <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry À stocker dans un endroit sec</p>		<p>Use by Date de péremption</p>		<p>Manufacturer Fabricant</p>		<p>Batch code Numéro de lot</p>
	<p>Consult instructions for use Consulter le mode d'emploi</p>		<p>Temperature limitation Limitation de la température</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Contient <n> test</p>	DIL	<p>Sample diluent Diluant d'échantillon</p>		<p>Catalogue number Numéro de référence</p>

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







CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01
VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC