

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Manuale per i seguenti codici:

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

da utilizzare con 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> & <i>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				
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 where the seal sheet is 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.

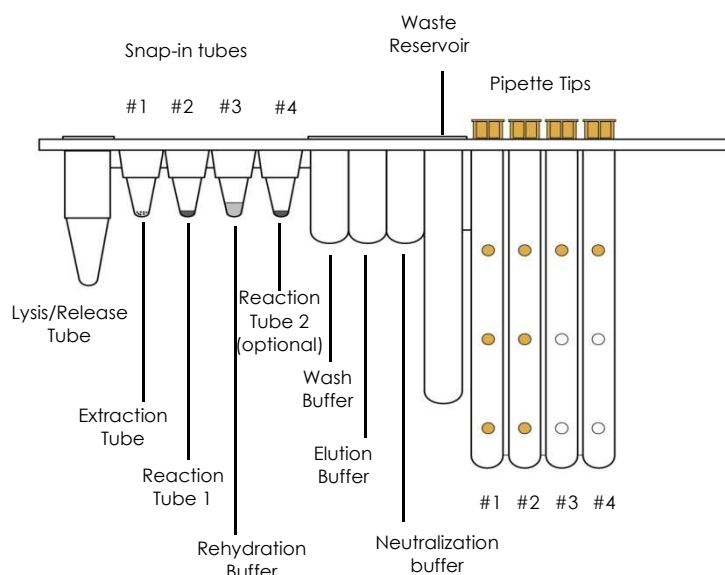


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

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).

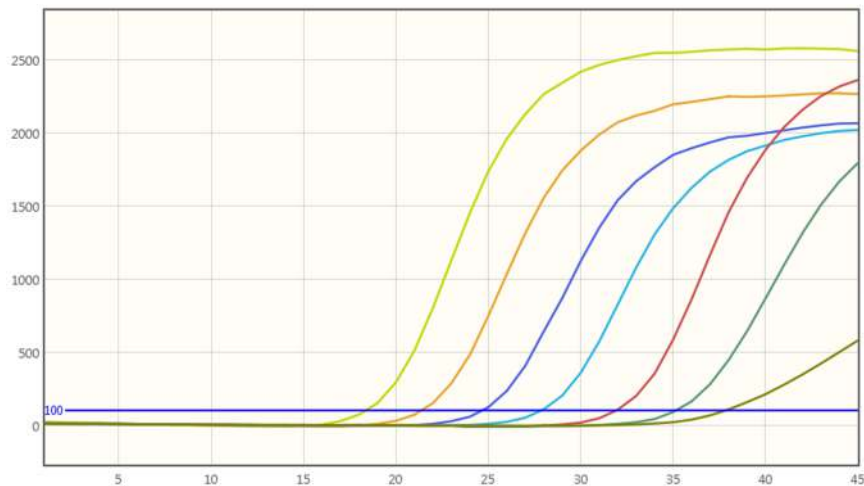


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

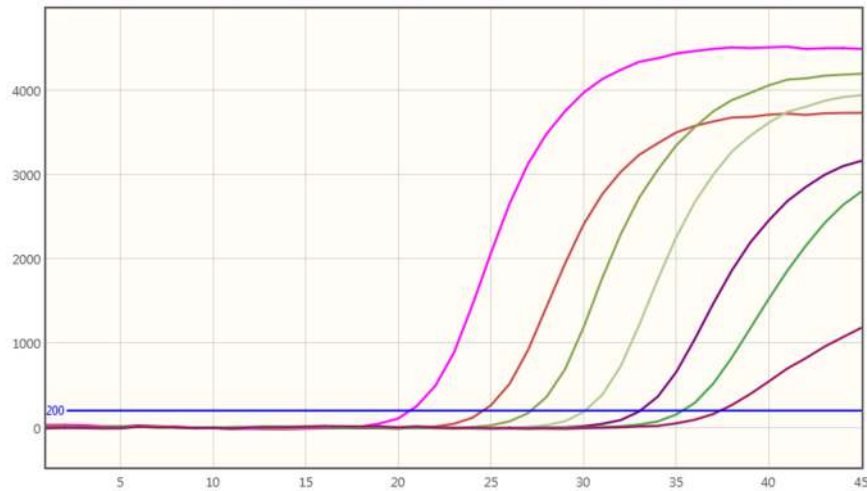
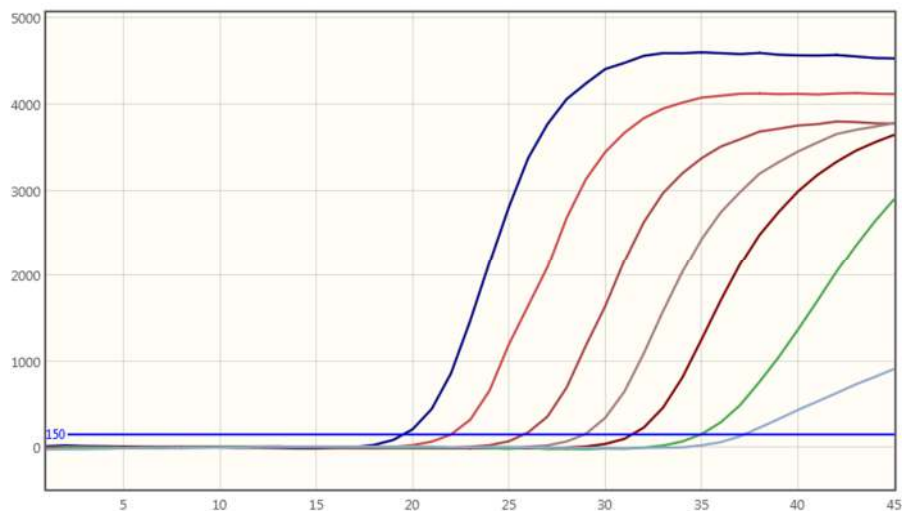


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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

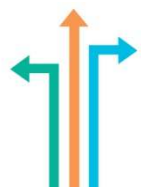
The reactivity of VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit for Flu A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013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



ITALIANO

1. Uso previsto

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit è realizzato per l'identificazione specifica e la tipizzazione di Influenza A, Influenza B e/o Virus Respiratorio Sinciziale umano (RSV) su campioni respiratori provenienti da pazienti con segni e sintomi di infezione respiratoria. L'uso previsto del test è quello di facilitare la diagnosi di infezione causata da Influenza A, Influenza B e/o RSV in combinazione con fattori di rischio clinico ed epidemiologico. Questo test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione di RNA e per la successiva RT-PCR in tempo reale sfruttando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e ai prodotti monouso del sistema BD MAX™. La rilevazione è realizzata utilizzando oligonucleotidi specifici e una sonda marcata con una molecola fluorescente e una *quencher* per rilevare l'Influenza A, l'Influenza B e l'RSV.

2. Introduzione e spiegazione

I virus dell'Influenza appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* e causano la maggior parte delle infezioni virali del tratto respiratorio inferiore. I virus dell'Influenza A e B sono una causa importante di morbilità e di mortalità in tutto il mondo, considerando che le persone in età avanzata e compromesse sono particolarmente a rischio di sviluppare malattie gravi e complicazioni come la polmonite. Le persone con influenza presentano tutti o alcuni di questi sintomi: febbre o sensazione febbrile/brividi, tosse, dolore alla gola, congestione e secrezione nasale, mialgia, dolore alla testa e anoressia. Il virus dell'Influenza può essere trasmesso da persona a persona in due modi diversi: attraverso l'aria (gocce e aerosol prodotti con la tosse e gli starnuti) e per contatto diretto o indiretto.

Il genoma dei virus di Influenza A e B è formato da otto segmenti di RNA monocatenario che codificano 11 o 12 proteine virali. La capsula virale, derivata dalla membrana plasmatica della cellula ospite, consiste in un doppio strato lipidico che contiene proteine transmembrana, come l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), e proteine di matrice M1 e M2. L'Influenza A si classifica in sottotipi basati sull'antigenicità delle sue molecole HA e NA, mentre l'Influenza B si divide in 2 lignaggi antigenicamente e geneticamente diversi, Victoria e Yamagata.

Il virus Respiratorio Sinciziale umano (RSV) appartiene alla famiglia *Paramyxoviridae* ed è l'agente virale causale più importante delle infezioni respiratorie acute. L'RSV è un virus incapsulato il cui genoma consiste in un RNA monocatenario lineare a polarità negativa (ssRNA-) non segmentato. Il virus Respiratorio Sinciziale umano è il principale agente causale di infezioni respiratorie come la bronchite, la polmonite e la broncopneumopatia cronica ostruttiva per tutta la popolazione in un ampio intervallo di età. I pazienti affetti spesso presentano tutti o alcuni di questi sintomi: diarrea, febbriattola, tosse, dolore alla gola, dolore alla testa e sibili respiratori.

L'RSV può essere trasmesso attraverso goccioline di secrezioni nasali prodotte durante la tosse o gli starnuti. Queste gocce entrano a contatto diretto o tramite auto-inoculazione dopo aver toccato le superfici contaminate con le membrane mucose di occhi, naso e bocca.

La diagnosi clinica può risultare problematica, dal momento che numerosi agenti patogeni causali di infezioni respiratorie acute producono quadri clinici simili. La PCR in tempo reale è il metodo prevalentemente utilizzato



per la diagnosi dell'Influenza A, dell'Influenza B e dell'RSV, in quanto è uno degli strumenti diagnostici più sensibili e specifici.

3. Procedimento

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit è stato realizzato per la diagnosi di Influenza A, Influenza B e/o RSV su campioni respiratori. La rilevazione viene effettuata tramite la retrotrascrizione e la successiva amplificazione in tempo reale della sequenza bersaglio, che avvengono entrambe nello stesso pozzetto. Dopo l'isolamento dell'RNA, si sintetizza il DNA complementare alla sequenza bersaglio grazie alla retrotrascrittasi o trascrittasi inversa. Successivamente, l'identificazione dell'Influenza A, dell'Influenza B e dell'RSV si realizza tramite la reazione a catena della polimerasi, utilizzando oligonucleotidi specifici e una sonda a fluorescenza che ibridano con una regione bersaglio conservata del gene *M1* per l'Influenza A e l'Influenza B e del gene *N* per l'RSV.

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit sfrutta l'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda unita alla sequenza del DNA complementare, separando il fluoroforo dal quencher. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità di RNA bersaglio. Questa fluorescenza può essere monitorata con lo strumento BD MAX™.

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit include in ogni pozzetto tutti i componenti necessari per completare la PCR in tempo reale (primer/sonde specifiche, dNTP, tampone, polimerasi, retrotrascrittasi) in forma stabilizzata e un controllo interno per monitorare l'inibizione dell'attività polimerasi. Dopo la reazione di amplificazione, l'Influenza A viene rilevata nel canale 475/520, l'Influenza B nel canale 585/630, l'RSV nel canale 630/665 e il controllo interno (CI) nel canale 530/565.

4. Reagenti forniti

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit include i materiali e i reagenti descritti nella Tabella 1:

Codice	Reagente/Materiale	Descrizione	Colore	Quantità
VS-ABR212R	Provetta di reazione per <i>Flu A, Flu B</i> e <i>RSV</i>	Una miscela di enzimi, primer-sonde, tamponi, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in forma stabilizzata	Trasparente Ghiera rossa	2 sacchetti da 12 provette
VS-RB05	Provetta con tampone per reidratazione	Soluzione per la ricostituzione del prodotto stabilizzato	Trasparente Ghiera viola	1 sacchetto da 24 provette

Tabella 1. Reagenti e materiali inclusi nel VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit con cod. VS-ABR124.



5. Reagenti e strumenti necessari ma non forniti

La seguente lista include i materiali richiesti che non vengono inclusi nel VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit.

- Strumento per la PCR in tempo reale: BD MAX™ System.
- Kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3 (cod: 442828).
- Cartucce per la PCR BD MAX™ (Cod: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1.000 µL).
- Punte con filtro.
- Guanti monouso senza talco.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- Il trasporto e la conservazione dei kit possono avvenire tra i 2 e i 40°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Proteggere i componenti dalla luce.

7. Precauzioni per l'utente

- Per l'uso professionale di diagnosi in vitro.
- Non si consiglia di utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta di controllo della confezione esterna è rotta o danneggiata.
- Non utilizzare i reagenti se l'imballaggio esterno è aperto o danneggiato al momento del ricevimento.
- Non utilizzare i reagenti se le confezioni o i sacchetti che proteggono le provette sono aperti o danneggiati al momento del ricevimento.
- Non utilizzare i tubi di reazione se il materiale essiccante incluso in ogni confezione di alluminio non è presente o è danneggiato.
- Non togliere il materiale essiccante dalle confezioni di alluminio che contengono le provette di reazione.
- Subito dopo ogni uso chiudere con la cerniera le confezioni di alluminio che proteggono le provette di reazione. Prima di chiudere le confezioni, eliminare ogni eccesso di aria.
- Non utilizzare le provette dei reagenti se l'alluminio a protezione è rotto o danneggiato.
- Non mescolare i reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. Una esposizione prolungata all'umidità può compromettere l'efficacia del prodotto.
- Nel caso in cui nello stesso laboratorio vengano realizzate altre analisi di PCR, assicurarsi che il test VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection kit, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, qualunque altro reagente aggiuntivo necessario per l'analisi e il sistema BD MAX™ non risultino contaminati. È necessario cambiarsi i guanti prima della movimentazione dei reagenti e delle cartucce della PCR.



- Organizzare un flusso di lavoro unidirezionale. Si deve iniziare nell'area di estrazione e successivamente passare all'area di amplificazione e rilevamento. Non mettere a contatto i campioni, gli strumenti e i reagenti utilizzati in un'area con la zona in cui viene realizzato il passaggio successivo.
- Seguire le buone pratiche di laboratorio. Utilizzare abiti protettivi, guanti monouso, occhiali e mascherina. Non mangiare, bere o fumare nella zona di lavoro. Una volta terminato il test, lavarsi le mani.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come i reagenti che gli sono stati a contatto, e devono essere gestiti rispettando le norme nazionali sui rifiuti sanitari. Prendere le dovute precauzioni durante la raccolta, la conservazione, il trattamento e lo smaltimento dei campioni.
- Si raccomanda la decontaminazione periodica degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette, e delle superfici di lavoro.
- Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per tutte le informazioni su avvertenze, precauzioni e procedimenti aggiuntivi.

8. Procedimento del test

8.1. RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Il VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato con campioni di tamponi faringei ottenuti con tamponi nasofaringei flessibili in nylon. Successivamente, il campione è stato immediatamente inserito nel mezzo di trasporto virale (Vircell, Spagna). In base alla letteratura, possono essere utilizzati campioni respiratori aggiuntivi di pazienti sintomatici (tamponi nasali/nasali profondi/nasofaringei, tamponi nasali e faringei combinati, aspirati nasofaringei/nasali/tracheali, lavaggi nasofaringei/nasali/faringei, lavaggi bronchioalveolari, espettorati), ma devono essere convalidati dall'utente.

Per la raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono essere seguite le condizioni convalidate dall'utente. In linea generale, i campioni respiratori devono essere raccolti ed etichettati correttamente in contenitori puliti con o senza mezzo di trasporto (in base al tipo di campione) ed essere elaborati nel più breve tempo possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati nel rispetto della normativa locale e nazionale per il trasporto dei campioni biologici. Per i trasporti lunghi di durata superiore alle 24 ore, si raccomanda di spedirli ad una temperatura $\leq 20^{\circ}\text{C}$. I campioni possono essere conservati ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C per 24 ore oppure possono essere congelati a -20°C o a -70°C per conservarli per un periodo prolungato. Si devono evitare cicli di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

8.2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE DELL'RNA

Realizzare la preparazione dei campioni seguendo le raccomandazioni che appaiono nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione utilizzato, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Tenere in considerazione che altri campioni possono richiedere un pre-trattamento. L'utilizzo di altri procedimenti specifici di preparazione ed estrazione deve essere convalidato dall'utente.



1. Pipettare 200-400 µL di campione clinico respiratorio in una provetta con tampone del sistema BD MAX™ ExK TNA-3 e chiudere la provetta con il tappo con setto. Assicurarsi che venga mescolato completamente girando la provetta per 1 minuto ad alta velocità.
2. Continuare con la sezione "8.3 Funzionamento del sistema BD MAX™".

8.3. FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA BD MAX™

Nota: Per favore, consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per informazioni più dettagliate.

8.3.1. Programmazione del test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit.

Nota: Se avete già creato il test per VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, potete saltare il passo 8.3.1 e andare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" del sistema BD MAX™, selezionare la scheda "Test Editor".
- 2) Cliccare sul pulsante "Create".
- 3) Nella finestra "Test Name", scrivere il nome del test: es. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) Nel menù a tendina "Extraction Type", selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menù a tendina "Master Mix Format", scegliere "Type 5".
 - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato insieme ad altri prodotti Viasure per BD MAX™, in questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In "Sample extraction parameters" selezionare "User defined" e regolare il volume a quello del campione clinico più 550 µL.
 - a. Esempio: Se si pipettano 200 µL di un campione clinico respiratorio in una provetta con tampone BD MAX™ ExK TNA-3, il parametro deve essere regolato a 750 µL.
 - b. Nota: il volume massimo è di 950 µL.
- 7) Su "Ct Calculation" selezionare "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) Nella scheda "PCR settings" inserire i seguenti parametri: "Channel Settings", "Gains" e "Threshold" (Tabella 2).
 - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato insieme ad altri prodotti Viasure per BD MAX™, in questo caso completare "PCR Settings" e "Test Steps" per entrambe le posizioni, 2 (verde) e 4 (blu).

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

Tabella 2. Impostazioni PCR.



- 9) Nella scheda "PCR settings" inserire anche i parametri "Spectral Cross Talk" (Tabella 3).

	Channel	False Receiving 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	-

Tabella 3. Parametri "Spectral cross-talk".

- 10) Nella scheda "Test Steps", inserire il protocollo di PCR (Tabella 4).

Nome passaggio	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	✓

Tabella 4. Protocollo PCR.

- 11) Cliccare sul pulsante "Save Test".

8.3.2. Preparazione del porta provette del sistema BD MAX™

- Per ciascun campione, raccogliere una striscia di reagente individuale (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) dal kit di estrazione (BD MAX™ ExK TNA-3 kit). Battere delicatamente ciascuna striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi rimangano sul fondo delle provette e posizionare la striscia di reagenti nel porta provette del sistema BD MAX™.
- Determinare e separare il numero di provette di reagente di estrazione necessari (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (ghiera bianca)) dal loro sacchetto protettivo. Inserire la provetta di reagente di estrazione (ghiera bianca) nella sua posizione corrispondente dentro la striscia di reagente TNA (Posizione 1. Codice di colore bianco nel porta provette. Vedere figura 1). Eliminare l'eccesso di aria e chiudere i sacchetti protettivi con la cerniera.
- Calcolare e separare il numero adeguato di provette di reazione del test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit (ghiera rossa) e collocarle nella loro posizione corrispondente della striscia (Posizione 2. Codice di colore verde nel porta provette. Vedere figura
 - Eliminare l'eccesso di aria e chiudere i sacchetti in alluminio con la cerniera.
 - Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.
 - Nota: Se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (sezione 8.3.1), calcolare e separare il numero adeguato di provette di reazione dei test VIASURE aggiuntivi (ghiera di colore diverso) e collocarle nella loro posizione corrispondente nella striscia (Posizione 4. Codice di colore blu nel



porta provette. Vedere figura 1). Eliminare l'eccesso di aria e chiudere i sacchetti in alluminio con la cerniera.

- 4) Prendere il numero necessario di provette con tampone di reidratazione (ghiera viola) e inserirle nella loro posizione corrispondente dentro alla striscia (Posizione 3. Privo di codice di colore nel porta provette. Vedere figura 1). Eliminare l'eccesso di aria e chiudere i sacchetti con la cerniera.
 - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.

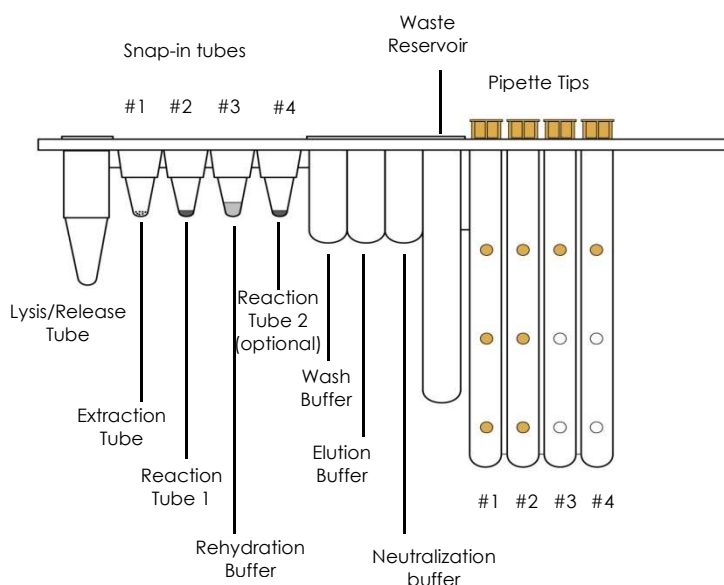


Figura 1. Striscia di reagenti individuali BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) del kit di estrazione BD MAX™ ExK TNA-3.

8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" sulla schermata "Run" utilizzando il software v4.50A o uno superiore del sistema BD MAX™.
- 2) Nel menù a tendina "Test", selezionare VIASURE Flu A, Flu B & RSV (se non è ancora stato creato, consultare la sezione 8.3.1).
- 3) Selezionare nel menù a tendina il numero di lotto del kit di estrazione utilizzato (situato sulla confezione esterna). Questo passaggio è opzionale.
- 4) Introdurre il numero di identificazione/codice a barre della provetta con tampone del campione BD MAX™ ExK TNA-3 nella finestra "Sample tube" della scheda "Work list", scansionando il codice a barre con il lettore o inserendolo manualmente.
- 5) Introdurre l'identificazione del campione/paziente nella finestra "Accession" della scheda "Work list" (se prevista) e cliccare sul pulsante "Save". Continuare fino a introdurre tutte le provette con il tampone del campione. Assicurarsi che l'identificazione del campione/paziente e le provette con il tampone del campione siano abbinate correttamente.
- 6) Posizionare il tampone di campione preparato nel(i) portaprovette del sistema BD MAX™.



- 7) Posizionare il (i) portaprovette nel sistema BD MAX™ (il portaprovette A si trova sul lato sinistro del sistema BD MAX™ mentre quello B si trova sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero necessario di cartucce PCR BD MAX™ nel sistema BD MAX™.
- 9) Chiudere la porta del sistema BD MAX™.
- 10) Premere "Start Run" per iniziare il procedimento.

8.3.4 Rapporto BD MAX™

- 1) Nel menù principale, cliccare sul pulsante "Results".
- 2) Fare doppio clic sul test incluso nella lista dei campioni o selezionare il test e premere il pulsante "View".
- 3) Cliccare sul pulsante "Print" e selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Cliccare sul pulsante "Print or Export" dalla schermata "Run Report".

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, consultare il manuale utente del sistema BD MAX™.

L'analisi dei dati viene effettuata con il software del sistema BD MAX™ secondo le istruzioni d'uso del produttore. Il software del sistema BD MAX™ fornisce i valori di Ct e mostra le curve di amplificazione per ciascuno dei canali di rilevamento di ogni campione analizzato nel seguente modo:

- Un valore di Ct pari a 0 indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct con la soglia specificata (vedere la Tabella 2). Se la curva di amplificazione mostra uno 0 come valore Ct, è necessario analizzarla manualmente.
- Un valore di Ct pari a -1 indica che non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione alla curva di amplificazione e secondo le modalità di interpretazione descritte nella Tabella 5.

Verificare l'emissione del segnale del controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Verificare inoltre che non sia presente nessuna anomalia nel sistema BD MAX™.

Con l'aiuto della seguente tabella, leggere e analizzare i risultati:



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	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione di PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.
IND	IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAXTM. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAXTM. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 5. Interpretazione

+: curva di amplificazione

-: senza curva di amplificazione

Un campione si considera positivo se il valore Ct ottenuto è inferiore a 40 e il controllo interno mostra o meno un grafico di amplificazione. A volte, l'individuazione del controllo interno non è necessario, dal momento che la presenza di un alto numero iniziale di copie di acido nucleico bersaglio può causare un'amplificazione preferenziale di quest'ultima.

Un campione si considera negativo se non si individua una curva di amplificazione al di sopra del valore soglia mentre il controllo interno la presenta. L'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno.

In caso di assenza del segnale di controllo interno nei pozzetti del campione, si raccomanda di ripetere il test diluendo il campione 1:10 o di ripetere l'estrazione per escludere possibili problemi di inibizione.

10. Limiti del test

- Il risultato del test deve essere valutato nel contesto dell'anamnesi, dei sintomi clinici e di altri test diagnostici effettuati dal personale sanitario.
- Questo test potrebbe essere utilizzato con diversi tipi di campione, a condizione che sia stato convalidato con campioni di tampone faringeo.



- Il corretto funzionamento del test dipende dalla qualità del campione; l'RNA deve essere estratto in modo corretto dai campioni respiratori. Un modo scorretto di raccolta, conservazione e/o trasporto dei campioni può portare a falsi negativi.
- È possibile individuare livelli estremamente bassi di copie bersaglio al di sotto del limite di individuazione, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con Influenza A, Influenza B e/o RSV, che si tratti di campioni che contengono alte concentrazioni di RNA bersaglio o di contaminazione dovuta a prodotti di PCR provenienti da reazioni anteriori.
- VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit può dare risultati non risolti se il campione contiene inibitori o se la provetta della miscela di reazione liofilizzata non è reidratata correttamente. Può dare risultati indeterminati o incompleti a seguito di un guasto dello strumento, e in questo caso è necessario ripetere il test.

11. Controllo di qualità

Il VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit include un controllo interno (CI) in ciascuna provetta di reazione che conferma il corretto funzionamento del test.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

Sono stati valutati 344 campioni respiratori (tamponi faringei) di pazienti sintomatici utilizzando il test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit. Questi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite un metodo di individuazione molecolare (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

I risultati sono stati i seguenti:

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

Tabella 6. Analisi comparativa dei risultati per l'Influenza A.

La percentuale di concordanza positiva è >98% e la percentuale di concordanza negativa è >96%.

* La bassa quantità di RNA target individuato in questi campioni si trova al di sotto del limite di rilevamento del metodo utilizzato.



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

Tabella 7. Analisi comparativa dei risultati per l'Influenza B.

La percentuale di concordanza positiva è >96% e la percentuale di concordanza negativa è >99%.

* La bassa quantità di RNA target individuato in questi campioni si trova al di sotto del limite di rilevamento del metodo utilizzato.

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

Tabella 8. Analisi comparativa dei risultati per RSV.

La percentuale di concordanza positiva è >84% e la percentuale di concordanza negativa è >99%.

* La bassa quantità di RNA target individuato in questi campioni si trova al di sotto del limite di rilevamento del metodo utilizzato.

I risultati mostrano un'alta sensibilità e specificità per individuare il virus di Influenza A, Influenza B e RSV utilizzando il test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilità analitica

Il test VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit ha un limite di individuazione di copie di RNA ≥ 10 per reazione per l'Influenza A, l'Influenza B e l'RSV (Figura 2, 3 e 4) con un tasso di accettazione $\geq$ del 95%.

Figura 2. Diluizioni in serie di uno standard di Influenza A (2×10^6 - 2×10^1 copie/reazione). Esperimento realizzato con lo strumento BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).



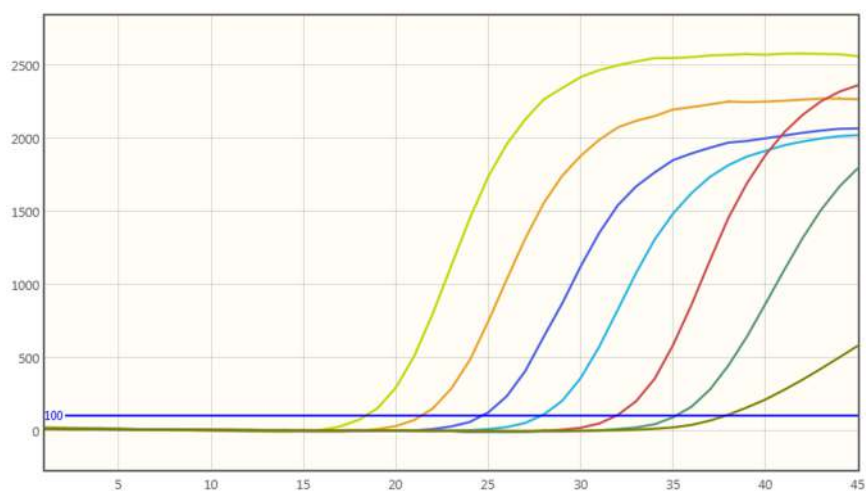


Figura 3. Diluizioni in serie di uno standard di Influenza B (2×10^6 - 2×10^1 copie/reazione). Esperimento realizzato con lo strumento BD MAX™ System (canale 585/630 (ROX)).

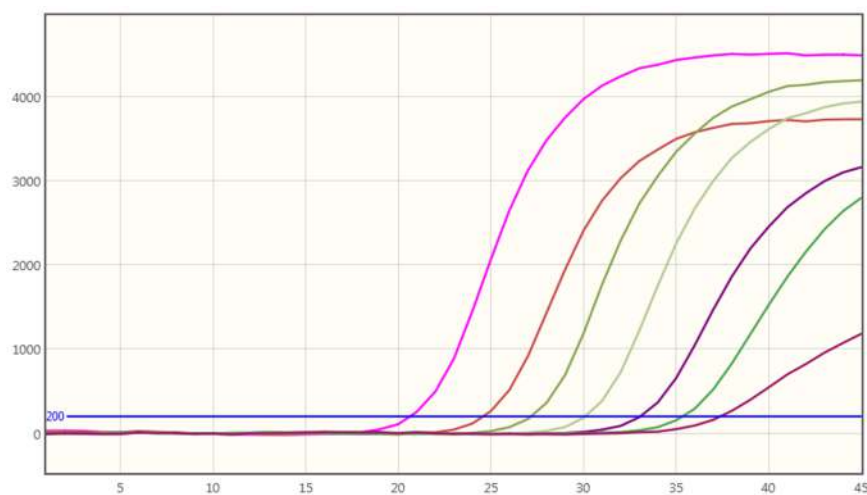
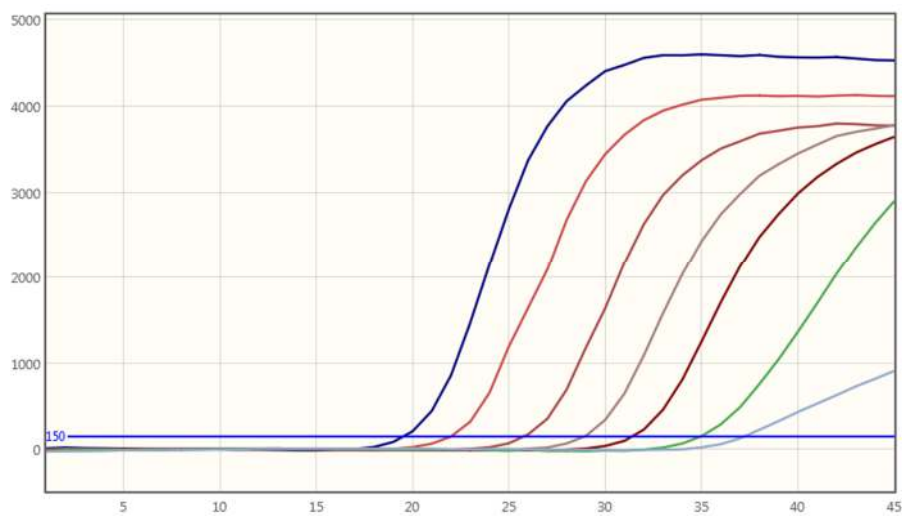


Figura 4. Diluizioni in serie di uno standard di RSV (2×10^6 - 2×10^0 copie/reazione). Esperimento realizzato con lo strumento BD MAX™ System (canale 630/665 (Cy5)).



12.3. Specificità analitica

La specificità del campione di Influenza A, Influenza B e RSV è stata confermata provando una serie di diversi microorganismi che rappresentano i patogeni respiratori più comuni. Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i seguenti microrganismi testati, ad eccezione dei patogeni target di ciascun test.

Test di reattività crociata					
<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/Reihenente/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	-/+		

Tabella 11. Microorganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

12.4. Reattività analitica

La reattività di VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit per l'Influenza A è stata valutata contro i ceppi 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) e A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, mostrando un risultato positivo.

La reattività di VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit per l'Influenza B è stata valutata contro i ceppi B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 eB/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016), mostrando un risultato positivo.

La reattività di VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit per l'RSV è stata valutata contro un virus respiratorio sinciziale umano (RSV A e B), mostrando un risultato positivo.

13. Bibliography/Bibliografia

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.



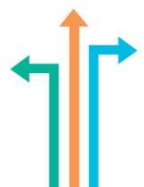
14. Symbols for IVD components and reagents/Simboli per reagenti e prodotti per la diagnosi in vitro

	Prodotto per diagnosi in vitro		Conservare in un luogo asciutto		Utilizzare entro		Produttore		Numero di lotto
	Prodotto per diagnosi in vitro		Conservare in un luogo asciutto		Utilizzare entro		Produttore		Numero di lotto
	Consultare le istruzioni prima dell'uso		Limite di temperatura		Contiene <n> test		Campione di diluente		Codice riferimento
	Consultare le istruzioni prima dell'uso		Limite di temperatura		Contiene <n> test	DIL	Campione di diluente		Codice riferimento

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



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC