

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Håndbok for følgende referanser:

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™
for bruk med BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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



3. Principle of the procedure

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

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

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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



8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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

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

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

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



- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 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.
 - 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.
 - 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.

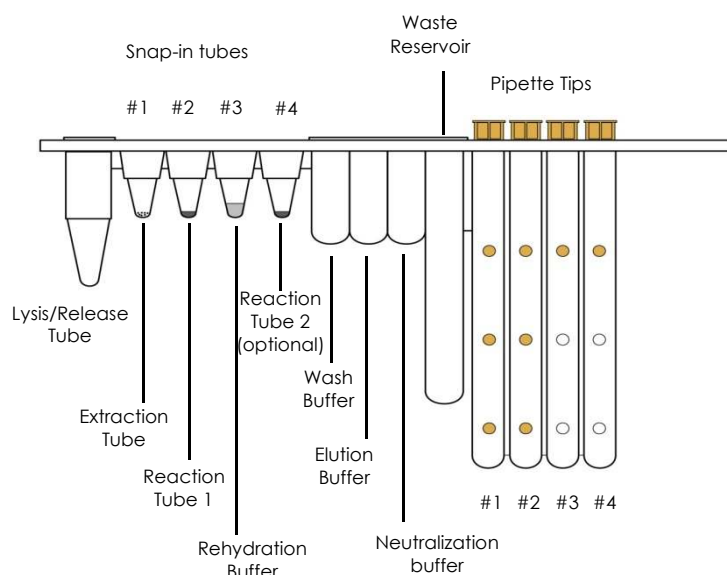


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

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 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 <i>Flu A</i> , <i>B</i> & 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 <i>Flu A</i> , <i>Flu B</i> & 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).

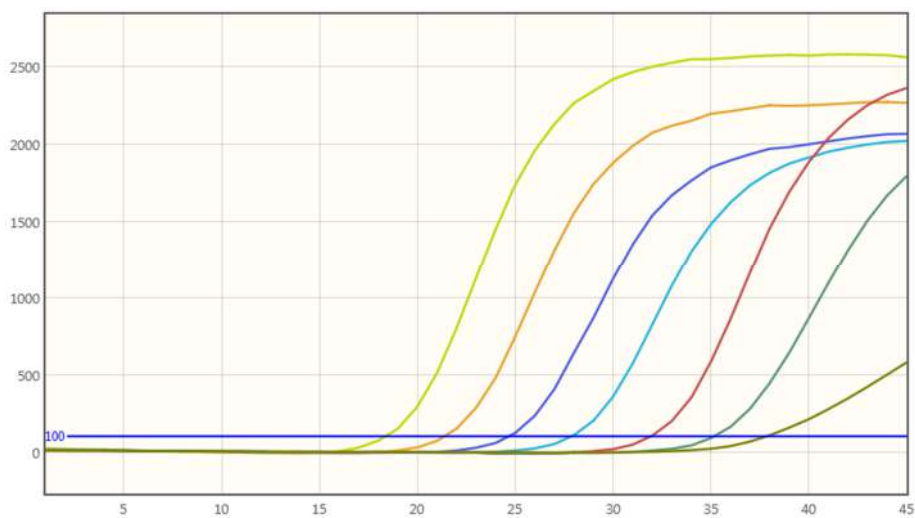
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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).

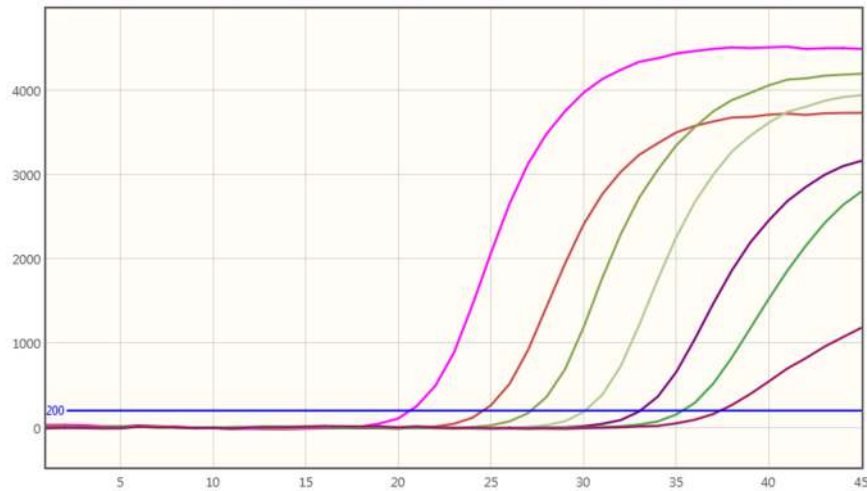
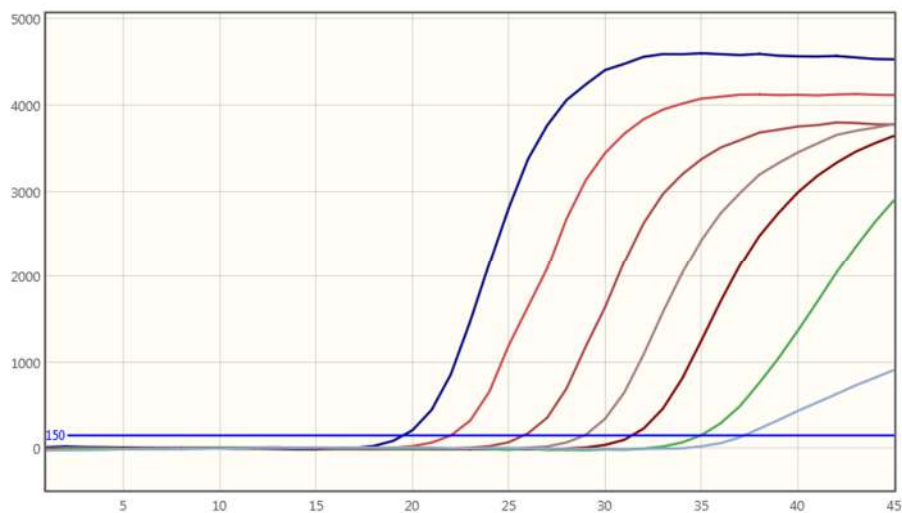


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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

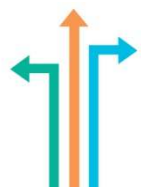
The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit for Flu A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013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



NORSK

1. BRUKSOMRÅDE

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit er beregnet til spesifikk identifikasjon og differensiering av influensa A, influensa B (Flu A og/eller B) og/eller human respiratorisk syncytialvirus (RSV) i luftveisprøver fra pasienter med tegn og symptomer på luftveisinfeksjon. Denne testen er beregnet som en hjelp til diagnostisering av influensa A, influensa B og/eller RSV kombinert med kliniske og epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet for ekstraksjon av RNA og påfølgende sanntids PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universelle reagenser og forbruksmateriell for BD MAX™-systemet. RNA fra kliniske prøver påvises ved hjelp av fluorescerende reporter-fargeprober som er spesifikke for influensa A, influensa B og RSV.

2. SAMMENDRAG OG FORKLARING

Influenzavirus hører til *Orthomyxoviridae*-familien og er årsak til flesteparten av virusinfeksjoner i de nedre luftveiene. Influensa A og B er en vesentlig årsak til morbiditet og mortalitet over hele verden, fordi eldre og svekkede personer har en særlig risiko for å utvikle alvorlig sykdom og komplikasjoner, slik som pneumoni. Pasienter har noen av disse symptomene eller alle: feber eller feberfølelse/kuldegysninger, hoste, sår hals, tett og rennende nese, myalgi, hodepine og nedsatt appetitt. Influenzavirus kan spres fra person til person på to forskjellige måter: gjennom luften (store dråper og aerosoler fra nys og hoste) og ved direkte eller indirekte kontakt.

Influensa A og B er kappekleddte, enkeltstrengede RNA-virus som inneholder åtte segmenterte strenger av genom-RNA, som typisk koder for 11 eller 12 virusproteiner. Viruskappen, som stammer fra vertens plasmamembran, består av et dobbelt lipidlag, som inneholder transmembrane proteiner, slik som hemagglutinin (HA) og neuraminidase (NA), og matriksproteinene M1 og M2. Influensa A-virus deles i undergrupper ut fra antigenisiteten i "HA-" og "NA-" molekylerne, mens influensa B er delt i 2 antigen og genetisk atskilte slekter, Victoria og Yamagata.

Humane respiratoriske syncytialvirus (RSV) hører til *Paramyxoviridae*-familien og er de viktigste virusstoffene ved akutte luftveisinfeksjoner. RSV er et kappekleddt, ikke-segmentert, negativt, enkeltstrengt lineært RNA-genomvirus. Respiratorisk syncytialvirus er en vanlig medvirkende årsak til luftveisinfeksjoner som bronkitt, pneumoni og kronisk obstruktiv lungesykdom hos mennesker i alle aldre. Pasienter har ofte noen av disse symptomene eller alle: rennende nese, lav feber, hoste, sår hals, hodepine og hvesende pust. RSV overføres via store dråper nasofaryngealt sekret fra infiserte personer, nær kontakt eller selvinokulasjon etter berøring av kontaminerte overflater.

Det kan være vanskelig å diagnostisere, da en lang rekke patogener kan forårsake akutte luftveisinfeksjoner som gir de samme kliniske syndromene. Det er påvist at PCR-analyse i sanntid er et følsomt og spesifikt diagnostisk verktøy til påvisning av influensa A-, influensa B- og RSV-virus.



3. Prosedyreprinsipper

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit er beregnet til diagnostisering av influensa A, influensa B og/eller RSV i luftveisprøver. Påvisningen foretas i et ettrins, sanntids RT-format, der revers transkripsjon og den påfølgende amplifikasjonen av den spesifikke målsekvensen skjer i samme reaksjonsrør. Det isolerte RNA-målet transkriberes ved å generere komplementært DNA via revers transkriptase som følges av amplifikasjon av et konserverte område av *M1*-genet for influensa A og influensa B og et konserverte område av *N*-genet for RSV ved hjelp av spesifikke primere og fluorescens-merkede prober.

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit er basert på DNA-polymerases 5' eksonuklease-aktivitet. Ved DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporter-fargen. Denne reaksjonen genererer en økning av fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av målmalen. Denne fluorescensen kan måles på BD MAX™-systemet.

Hvert rør i VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit inneholder alle komponenter som trengs for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase, revers transkriptase) i et stabilisert format, samt intern kontroll til monitorering av PCR-hemming. Influensa A RNA-mål forsterkes og påvises i kanal 475/520, influensa B RNA i kanal 585/630, RSV RNA i kanal 630/665 og den interne kontrollen (IC) i kanal 530/565.

4. Reagenser som følger med

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit inneholder følgende materialer og reagenser, som beskrevet i tabell 1.

Referanse	Reagens/materiale	Beskrivelse	Farge	Antall
VS-ABR212R	<i>Flu A</i> , <i>Flu B</i> & RSV-reaksjonsrør	En blanding av enzymer, primere, prober, buffer, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i stabilisert format	Gjennom-siktig rød folie	2 poser a 12 rør
VS-RB05	Rør med rehydreringsbuffer	Oppløsning til rekonstitusjon av det stabiliserte produktet	Gjennom-siktig lilla folie	1 pose a 24 rør

Tabell 1. Reagenser og materialer som følger med i VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit med ref. VS-ABR124.

5. Reagenser og utstyr som må skaffes til veie av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke følger med i VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (ref.: 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref.: 437519)
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet på 2–1000 µL).
- Filterspisser
- Pudderfrie engangshansker



6. Betingelser for transport og oppbevaring

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Komponentene må ikke utsettes for sollys.

7. Forholdsregler for brukere

- Til profesjonell in vitro-diagnostisk bruk.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er utgått på dato.
- Du må ikke bruke settet hvis etiketten som forsegler den ytre boksen, er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesboksen er åpen eller har rifter ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller har rifter ved levering.
- Du må ikke bruke reagenser hvis reagensposer ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Posene som beskytter reagensene skal umiddelbart etter bruk lukkes med forseglingen. Fjern eventuell overflødig luft i posene før du forseglar dem.
- Bruk ikke reagensene hvis pakken er åpnet eller skadet.
- Ikke bland reagensene fra ulike poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagensene mot fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktets ytelse.
- I tilfeller der kultur eller andre PCR-tester utføres i samme generelle område av laboratoriet, må du være forsiktig, slik at ikke VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3-ekstraksjonssettet, eventuelle andre reagenser som er nødvendige for testing, og BD MAX™ System kontamineres. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter.
- Utarbeid en ensrettet arbeidsflyt. Den bør begynne i ekstraksjonsområdet og fortsette til amplifikasjons- og påvisningsområdet. La ikke prøver, utstyr og reagenser komme tilbake til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg alltid god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk eller røyk i arbeidsområdet. Vask hendene når du er ferdig med testen.
- Prøvene skal behandles som potensielt smittefarlige, og det samme gjelder alle reagenser og materialer som har vært eksponert for prøvene. Dessuten skal de håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, behandling og kassering av prøver.
- Regelmessig dekontaminering av vanlig brukt utstyr anbefales, særlig mikropipetter og arbeidsflater.
- Se i brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.



8. Testprosedyre

8.1. INNHENTING, OPPBEVARING OG TRANSPORT AV PRØVER

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit har blitt validert på halspenselprøver som ble innsamlet med fleksible nasofaryngeale prøvepensler med velurisert nylon og straks plassert i virustransportmedium (Vircell, Spania). Ytterligere luftveisprøver fra symptomatiske pasienter kan testes ifølge litteraturen (dvs. nasale/dypnasale/nasofaryngeale penselprøver, kombinerte nese- og halspenselprøver, nasofaryngeale/nasale/trakeale aspirater, nasofaryngeale/nasale/halsskyllinger, bronkoalveolær utskylning, sputum), men må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal skje under forholdene som er validert av brukeren. Generelt skal luftveisprøver innsamles og merkes korrekt i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles raskest mulig for å garantere testens kvalitet. Prøvene skal transporteres i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogen materiale. Ved langvarig transport (over 24 timer) anbefaler vi forsendelse ved $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Prøver kan oppbevares ved $2-8^{\circ}\text{C}$ i opptil 24 timer eller frosset ved -20°C eller -70°C ved langtidsoppbevaring. Gjentatte sykluser med frysing og tining bør unngås for å hindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

8.2. KLARGJØRING AV PRØVER OG RNA-EKSTRAKSJON

Klargjør prøven ifølge anbefalingene i bruksanvisningen til det brukte ekstraksjonssettet, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon for den spesifikke anvendelsen skal utarbeides og valideres av brukeren.

1. Pipetter 200-400 μL av den kliniske luftveisprøven ned i et BD MAX™ TNA-3-prøvebufferrør, og lukk røret med en membranhet. Sørg for å blande prøven helt ved hjelp av virvelblanding ved høy hastighet i ett (1) minutt.
2. Gå videre til bruk av BD MAX™-systemet.

8.3. PCR-PROTOKOLL

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for detaljerte instruksjoner.

8.3.1. Oppretting av PCR-testprogram for VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) i skjermbildet "Run" (Kjør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Gi testen navn i vinduet "Test Name" (Testnavn): dvs. VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV.
- 4) Velg "ExK TNA-3" i rullegardinmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype).
- 5) Velg "Type 5" i rullegardinmenyen "Master Mix Format".



- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ekstra Viasure for BD MAX test. I så fall velger du "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbelt mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5))
- 6) Velg "User defined" (Brukerdefinert) i "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), og juster prøvevolumet til volumet av den brukte kliniske prøven pluss 550 µL.
- a. Eksempel: Hvis det pipetteres 200 µL av den kliniske luftveisprøven ned i et BD MAX TNA-3-prøvebufferør, skal parameteren settes til 750 µL.
- b. Merk: maksimumsinnstillingen er 950 µL.
- 7) Velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Anrop Ct ved terskelkryssing) i "Ct Calculation" (Ct-beregning).
- 8) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) angir du følgende parametere: "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Channel Settings" (Terskel) (tabell 2).
- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med ytterligere en Viasure for BD MAX test. I så fall skal PCR-innstillinger og testtrinn utføres for posisjonene 2 (grønn) og 4 (blå).

Kanal	Alias	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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

Tabell 2. PCR-innstillinger.

- 9) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) angir du følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral kryssstale) (tabell 3) samt

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)				
Kanal		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksiteringskanal)	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	-

Tabell 3. Parametere for spektral kryssstale.

- 10) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) angir du PCR-protokollen (tabell 4).

Trinnavn	Profiltype	Sykluser	Time (s) (Tid(er))	Temperatur	Påvis
Revers transkripsjon	Vent	1	900	45 °C	-
Innledende denaturering	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturering og herding/forlengelse (datainnnsamling)	2 - Temperatur	45	10	95 °C	-
			61.1	63 °C	✓

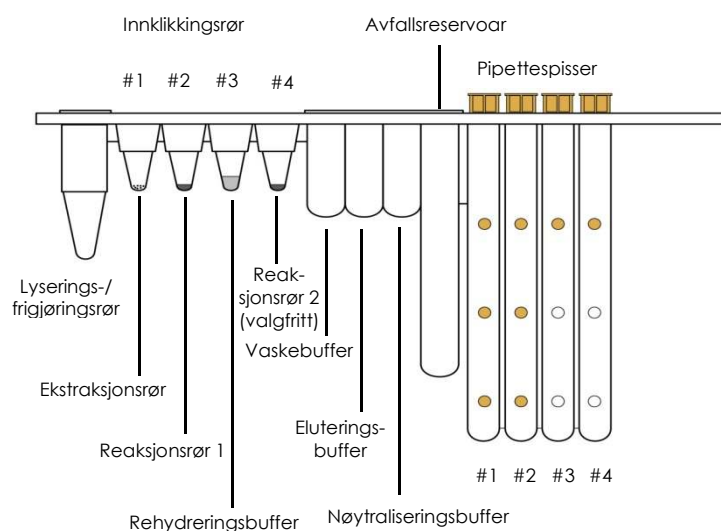
Tabell 4. PCR-protokoll.



- 11) Klikk på knappen "Save Test" (Lagre test).

8.3.2. BD MAX™-stativoppsett

- 1) For hver prøve som skal testes, fjernes en separat modulreagensstrimmel (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) fra BD MAX™ ExK TNA-3-settet. Bank hver strimmel lett mot en hard overflate for å sikre at alle væskene er i bunnen av rørene, og sett den i BD MAX™-systemets prøvestativ.
- 2) Ta det nødvendige antallet BD MAX™ ExK™ TNA-ekstraksjonsrør (B4) (hvit folie) fra den beskyttende posen. Klikk ekstraksjonsrøret/-rørene (hvit folie) på plass i de tilsvarende posisjonene i TNA (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1). Fjern overflødig luft, og lukk posen med vakuumforseglingen.
- 3) Fastslå og atskill riktig antall VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV-reaksjonsrør (rød folie), og klikk dem på plass i de tilsvarende posisjonene i strimmelen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur.
 - a. Fjern overskytende luft, og lukk aluminiumsposene med glidelåslukningen.
 - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen.
 - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbelt mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), fastsetter og atskiller du riktig antall VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikker dem på plass i de tilsvarende posisjonene i strimmelen (posisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1). Fjern overskytende luft, og lukk aluminiumsposene med glidelåslukningen.
- 4) Fjern nødvendig antall rehydreringsbufferrør (lilla folie), og klikk dem på plass i de tilsvarende posisjonene i strimmelen (posisjon 3, ingen fargekode på stativet. Se figur 1). Fjern overskytende luft, og lukk posen med glidelåslukningen.
 - a. For riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen



Figur 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) fra BD MAX™ ExK TNA-3-settet.

8.3.3. Oppsett av BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen “Work List” (Arbeidsliste) på skjermbildet “Run” (Kjør) i BD MAX™ systemets programvare v4.50A eller nyere.
- 2) Velg VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* i rullegardinmenyen “Test” (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (på den ytre boksen) i rullegardinmenyen (valgfritt).
- 4) Angi ID-nummer for prøvebufferrøret i vinduet Sample tube (Prøverør) i arbeidslisten enten ved å skanne strekkoden med skanneren eller ved å legge inn informasjonen manuelt.
- 5) Angi prøve-ID og pasient-ID i vinduet Accession (Tilgang) i Worklist (Arbeidsliste) (hvis aktuelt), og klikk på knappen “Save” (Lagre). Fortsett til alle prøvebufferør er lagt inn. Kontroller at prøve-ID/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Sett det klagjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet.
- 7) Sett stativet/stativene i BD MAX™-systemet (stativ A plasseres i venstre side av BD MAX™ systemet og stativ B i høyre side).
- 8) Plasser nødvendig antall av BD MAX™ PCR-kassetter i BD MAX™-systemet.
- 9) Lukk døren til BD MAX™-systemet.
- 10) Klikk på “Start Run” (Start kjøring) for å begynne kjøringen.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Klikk på knappen “Results” (Resultater) på hovedmenyen.
- 2) Dobbeltklikk kjøringen i listen eller trykk på knappen “View” (Vis).
- 3) Klikk på “Print” (Skriv ut) og velg: “Run Details, Test Details and Plot...” (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott)
- 4) Klikk på knappen “Print or Export” (Skriv ut eller eksporter) på skjermbildet “Run Reports” (Kjøringsrapporter)

9. Tolkning av resultater

Hvis du vil ha en detaljert beskrivelse av hvordan data skal analyseres, se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet.

Dataanalysen gjøres av BD MAX™-programvaren i samsvar med produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 angir at det ikke ble beregnet noen Ct-verdi av programvaren med den angitte terskelen (se tabell 4). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må kontrolleres manuelt.
- En Ct-verdi på -1 indikerer at ingen gyldig amplifikasjonsprosess har funnet sted.
- Alle andre eventuelle Ct-verdier må tolkes i samsvar med amplifikasjonskurven og i henhold til tolkningsretningslinjene som er oppgitt i tabell 5.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer korrekt. Kontroller også at det ikke er noen rapport om feil ved BD MAX™-systemet.



Bruk tabellen nedenfor til å lese og analysere resultatene:

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Intern kontroll (530/565)	Interpretation
-	-	-	+	Flu A, Flu B og RSV negativ
+	+	+	+/-	Flu A, Flu B og RSV positiv
+	-	-	+/-	Flu A positiv, Flu B og RSV negativ
+	+	-	+/-	Flu A og Flu B positiv og RSV negativ
+	-	+	+/-	Flu A og RSV positiv og Flu B negativ
-	+	-	+/-	Flu B positiv, Flu A og RSV negativ
-	+	+	+/-	Flu B og RSV positiv, Flu A negativ
-	-	+	+/-	RSV positiv, Flu A og Flu B negativ
UNR	UNR	UNR	UNR	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- eller forsterkningstrinn forekommer.
IND	IND	IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.

Tabell 5. Tolkning av prøver

+: Amplifikasjonskurve

-: Ingen amplifikasjonskurve

En prøve anses for positiv hvis Ct-verdien er under 40. Den interne kontrollen kan vise et amplifikasjonssignal, men gjør det ikke nødvendigvis, da et høyt kopiantall for målet kan forårsake amplifikasjon fortrinnsvis av målspesifikke nukleinsyrer i stedet for den interne kontrollen. I slike tilfeller er påvisning av den interne kontrollen ikke nødvendig.

En prøve anses for negativ hvis den ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet, og den interne kontrollen er positiv. Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes via amplifikasjonen av den interne kontrollen.

I tilfelle av uavklarte resultater, fravær av signal fra intern kontroll i en negativ prøve, anbefaler vi å gjenta analysen med en fortynnet prøve 1:10 for å sjekke for mulige hemmingsproblemer.

10. Begrensninger ved testen

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med medisinsk historikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan foretas med andre typer prøver, er den blitt validert med halspenselprøver.
- Testens kvalitet avhenger av kvaliteten av prøven. Det må ekstraheres passende RNA fra kliniske prøver. Feil innsamling, oppbevaring og/eller transport av prøver kan gi falske negative resultater.
- Ekstremt lave nivåer av målet under LoD kan påvises. Det kan hende at resultatene ikke vil kunne reproduseres.



- Det er mulighet for falske positive resultater som skyldes krysskontaminering med Flu A, Flu B og/eller RSV, enten ved prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-RNA, eller ved kontaminering som skyldes PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- Resultatene som er oppnådd med VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit kan være uavklarte fordi prøven inneholder hemmere eller på grunn av feil rehydrering av røret med den frysetørkede reaksjonsblandingen eller kan være ubestemmelig eller ufullstendig på grunn av instrumentfeil, og krever i tilfelle ny prøving.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit inneholder en intern kontroll i hvert reaksjonsrør, som bekrefter at teknikken fungerer korrekt.

12. Egenskaper ved utførelsen

12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit ble testet med 344 luftveisprøver (halspenselprøver) fra symptomatiske pasienter. Disse resultatene ble sammenlignet med resultater oppnådd med en molekylær påvisningsmetode (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Resultatene var som følger:

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

Tabell 6. Sammenligningsresultater for influensa A.

Positivt prosentvis samsvar er >98 %, og negativt prosentvis samsvar er >96 %.

*Den lave mengden mål-RNA i denne luftveisprøven ligger under påvisningsgrensen for den brukte metoden.

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

Tabell 7. Sammenligningsresultater for influensa B.

Positivt prosentvis samsvar er >96 %, og negativt prosentvis samsvar er >99 %.

*Den lave mengden mål-RNA i denne luftveisprøven ligger under påvisningsgrensen for den brukte metoden.



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

Tabell 8. Sammenligningsresultater for RSV.

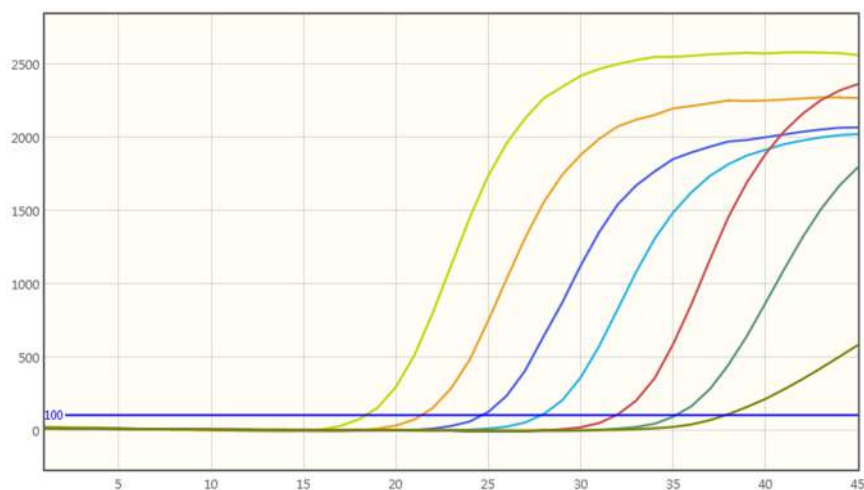
Positivt prosentvis samsvar er >84 %, og negativt prosentvis samsvar er >99 %.

*Den lave mengden mal-RNA i denne luftveisprøven ligger under påvisningsgrensen for den brukte metoden

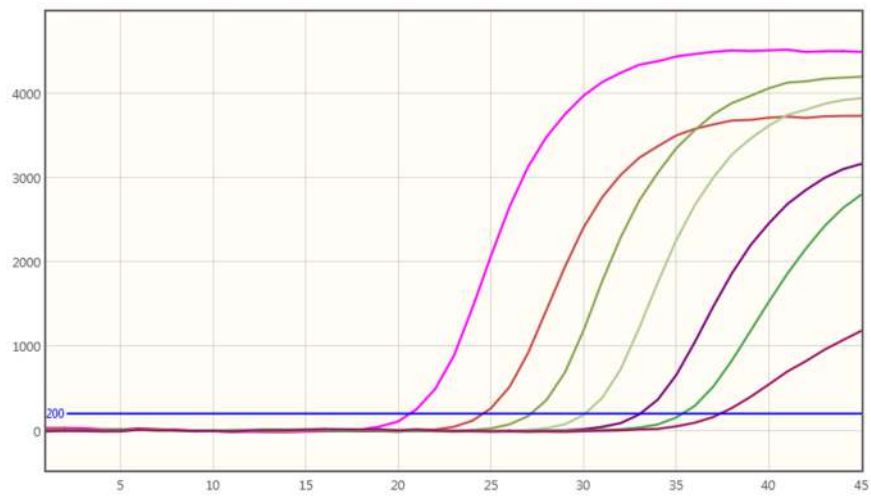
Resultatene viser høy sensitivitet og spesifisitet til påvisning av influensa A-, influensa B- og/eller RSV-virus med VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit.

12.2. Analytisk sensitivitet

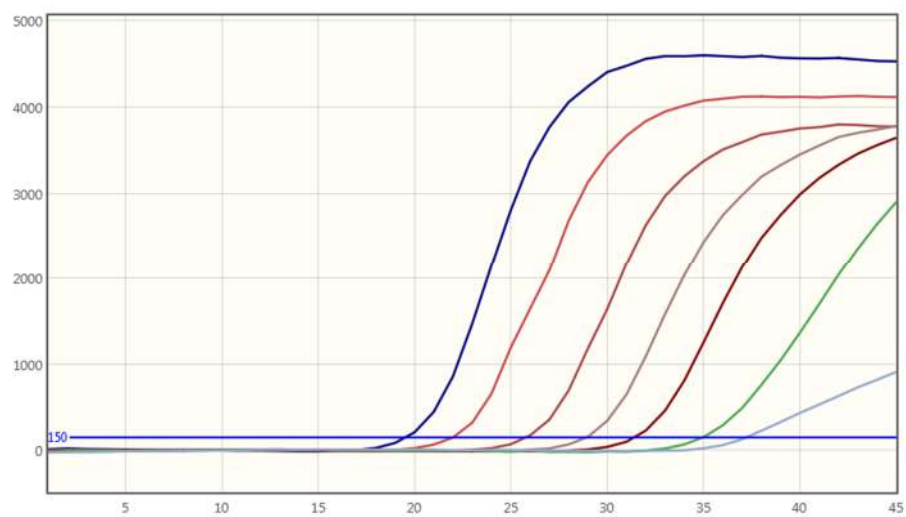
VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit har en påvisningsgrense på ≥ 10 RNA-kopier per reaksjon for influensa A, influensa B og RSV med en positiv forekomst på ≥ 95 % (figur 2, 3 og 4).

Figur 2. Fortynningsserie for influensa A (2×10^6 - 2×10^1 kopier/reaksjon). Mal kjørt på BD MAX™-systemet (475/520 (FAM) kanal).

Figur 3. Fortynningsserie for influensa B ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ kopier/reaksjon). Mal kjørt på BD MAX™-systemet (585/630 (ROX) kanal).



Figur 4. Fortynningsserie for RSV ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^0$ kopier/reaksjon). Mal kjørt på BD MAX™-systemet (630/665 (Cy5) kanal).



12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisiteten for analysen av influensa A, influensa B og RSV ble bekreftet ved test av et panel bestående av ulike mikroorganismer som representerte de vanligste luftveispatogenene. Ingen kryssreaktivitet ble påvist blant noen av de følgende testede mikroorganismer, bortsett fra målpatogenene for hver analyse:

Kryssreaktivitet 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	-/+		

Tabell 9. Patogene referansemikroorganismer brukt i denne studien.



12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit for influenza B ble vurdert i forhold til følgende stammer: AA/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) og A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus med positive resultater.

Reaktiviteten til VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit for influenza B ble vurdert i forhold til følgende stammer: 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 med positive resultater.

Reaktiviteten til VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit for RSV ble vurdert i forhold til human respiratorisk syncytialvirus (RSV A og B) med positive resultater.

13. Bibliography/Bibliografi

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.

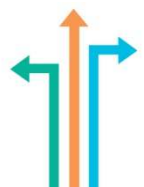
14. Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

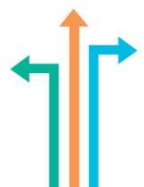
	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostisk anordning		Keep dry Oppbevar tørt		Use by Brukes innen		Manufacturer Produsent		Batch code Lotnummer
	Consult instructions for use Se bruksanvisningene		Temperature limitation Temperaturbegrensning		Contains sufficient for <n> test Inneholder nok for <n> tester		Sample diluent Prøvediluent		Catalogue number Katalognummer

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.cer-test.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC