

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Podręcznik dotyczy urządzeń z poniższymi kodami/

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

do stosowania razem z BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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



3. Principle of the procedure

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

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

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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



- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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



8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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

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

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"



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

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

Table 2. PCR settings.

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

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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 4. PCR protocol.

- 11) Click the "Save Test" button.



8.3.2. BD MAX™ Rack set up

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

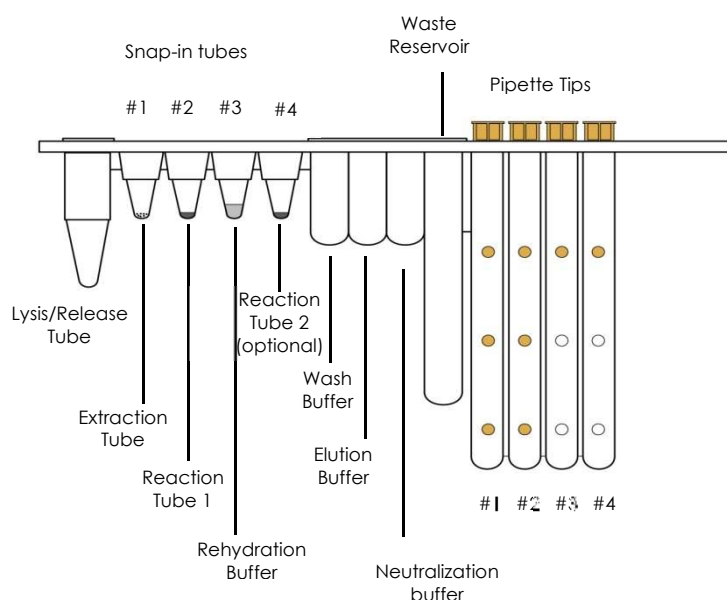


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV (if not already created see Section 8.3.1).

- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID into Accession window of the Worklist (if applicable) and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4 BD MAX™ Report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

Using the following table read and analyze the results:



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

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with throat swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Flu A, Flu B and/or RSV, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.



- The results obtained with VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit may be Unresolved due to the sample contains inhibitors 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 <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).

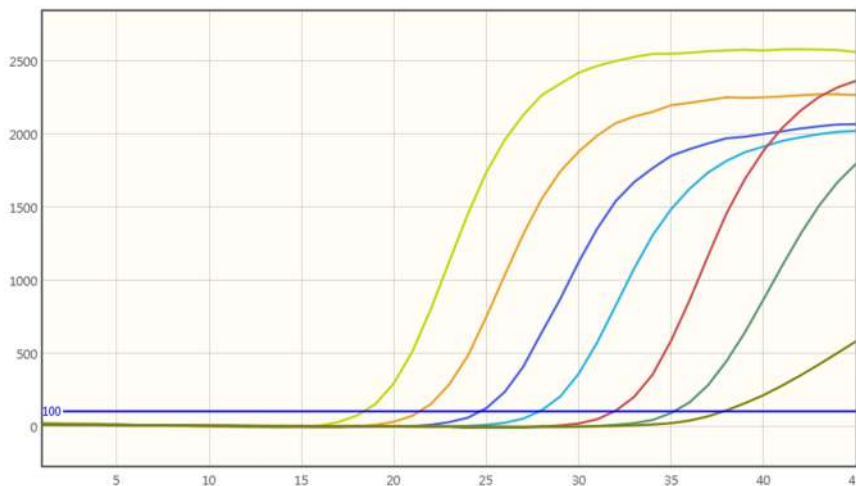
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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).

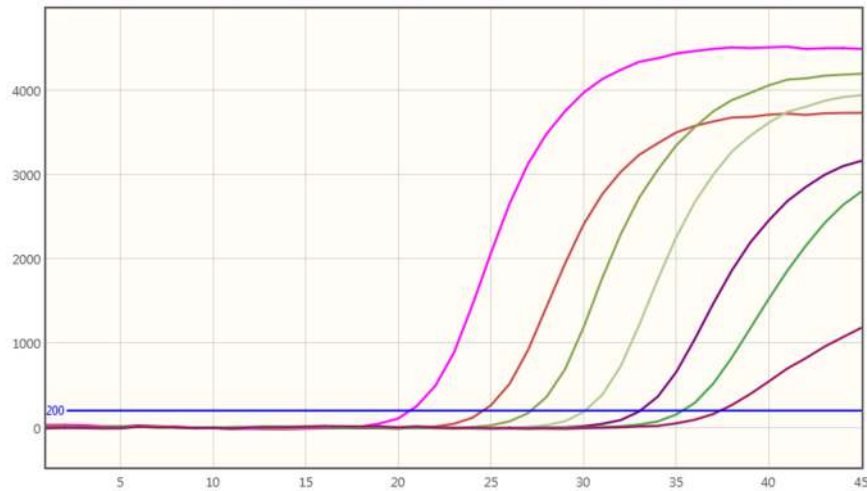
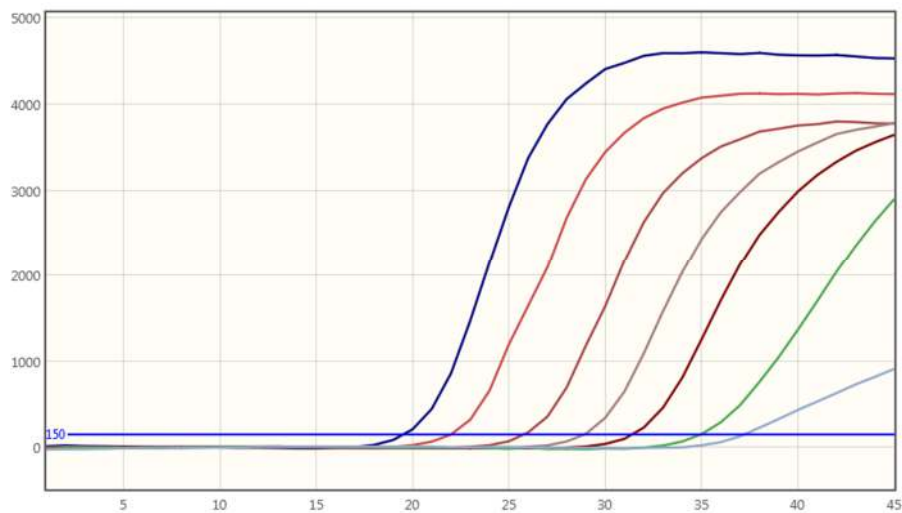
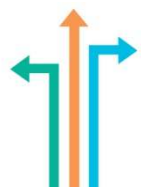


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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

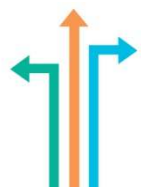
The reactivity of VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit for Flu A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013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



JĘZYK POLSKI

1. Przeznaczenie

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym jest przeznaczony do swoistej identyfikacji i różnicowania grypy typu A, grypy typu B (grypa typu A i (lub) B) i (lub) ludzkiego wirusa syncytialnego dróg oddechowych (RSV) w próbkach pobranych z dróg oddechowych pacjentów z podmiotowymi i przedmiotowymi objawami zakażenia dróg oddechowych. Niniejszy test jest przeznaczony do stosowania w celu wspomagania rozpoznawania grypy typu A, grypy typu B i (lub) RSV w skojarzeniu z klinicznymi i epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ do ekstrakcji RNA, a następnie RT-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™. RNA z próbek klinicznych jest wykrywane za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla grypy typu A, grypy typu B oraz RSV.

2. Streszczenie i objaśnienia

Wirusy grypy należą do rodziny *Orthomyxoviridae* i powodują większość wirusowych zakażeń dolnych dróg oddechowych. Grypa typu A i grypa typu B stanowią znaczącą przyczynę zachorowań i zgonów na całym świecie, uwzględniając fakt, że osoby w podeszłym wieku oraz osłabione są szczególnie narażone na wystąpienie ciężkiej choroby i powikłań, takich jak zapalenie płuc. Osoby zarażone odczuwają niektóre lub wszystkie z wymienionych objawów: gorączka lub poczucie gorączki/dreszcze, kaszel, ból gardła, niedrożność nosa i wydzielina z nosa, bóle mięśniowe, bóle głowy i jadłowstręt. Wirusy grypy mogą rozprzestrzeniać się pomiędzy ludźmi na dwa różne sposoby: przez powietrze (duże krople i aerozole powstające w wyniku kichania i kaszlu) oraz przez bezpośredni i pośredni kontakt.

Wirusy grypy typu A i B są otaszczonymi wirusami o pojedynczej nici RNA, zawierającymi osiem segmentowanych nici RNA genomu, które zazwyczaj kodują 11 lub 12 białek wirusowych. Płaszcz wirusa, pochodzący z błony plazmatycznej gospodarza, składa się z podwójnej warstwy lipidów zawierających białka przebłonowe, takie jak hemagglutyna (HA) i neuramidaza (NA) oraz białka macierzy M1 i M2. Wirusy grypy typu A dzieli się na podtypy w zależności od antygenowości ich cząsteczek „HA” i „NA”, natomiast wirus grypy typu B dzieli się na dwie linie, odrębne pod względem antygenowym i genetycznym – Victoria i Yamagata.

Ludzkie wirusy syncytialne dróg oddechowych (RSV) należą do rodziny *Paramyxoviridae* i stanowią najważniejsze wirusowe czynniki wywołujące ostre zakażenia dróg oddechowych. RSV są otaszczonymi, niesegmentowanymi wirusami o genomie zawierającym pojedynczą nić liniowego RNA. Wirus syncytialny dróg oddechowych stanowi czynnik często przyczyniający się do zakażeń dróg oddechowych, powodujący zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc oraz przewlekłe obturacyjne zakażenia płuc u osób w każdym wieku. Osoby zarażone często odczuwają niektóre lub wszystkie z wymienionych objawów: wyciek z nosa, niska gorączka, kaszel, ból gardła, ból głowy i świszczący oddech. Wirus RSV jest przenoszony przez duże krople wydzieliny z nosa i gardła zarażonej osoby, bliski kontakt lub samozarażenie po dotknięciu skażonych powierzchni.



Rozpoznanie może stanowić problem, ponieważ liczne patogeny mogą powodować ostre zakażenia dróg oddechowych dające podobne objawy. Wykazano, że oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym stanowią czułe i swoiste narzędzia diagnostyczne do wykrywania wirusów grypy typu A, grypy typu B oraz RSV.

3. Zasada oznaczania

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywisty jest przeznaczony do rozpoznawania grypy typu A, grypy typu B i (lub) RSV w próbkach pobranych z dróg oddechowych. Wykrywanie opiera się na jednoetapowym formacie oznaczania w czasie rzeczywistym, w którym odwrotna transkrypcja, a następnie amplifikacja swoistych docelowych sekwencji odbywa się w tej samej probówce reakcyjnej. Docelowa sekwencja izolowanego RNA podlega transkrypcji za pomocą odwrotnej transkryptazy, generując komplementarne DNA, a następnie amplifikacji konserwatywnego regionu genu *M1* w przypadku grypy typu A, grypy typu B oraz konserwatywnego regionu genu *N1* w przypadku wirusa RSV przy użyciu swoistych starterów oraz sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnym.

Zasada działania VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywisty opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Tę fluorescencję można zmierzyć za pomocą systemu BD MAX™.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywisty zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sony, dNTPS, bufor, polimeraza, odwrotna transkryptaza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną do monitorowania hamowania PCR. Sekwencje docelowe RNA grypy typu A ulegają amplifikacji oraz wykrywaniu w kanale 475/520, RNA grypy typu B w kanale 585/630, RNA RSV w kanale 630/665, a kontrola wewnętrzna (IC) w kanale 530/565.

4. Dostarczane odczynniki

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywisty zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w Tabeli 1:

Kod	Odczynnik/materiał	Opis	Kolor	Ilość
VS-ABR212R	Grypa typu A, Grypa typu B i RSV - probówka reakcyjna	Mieszanina enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontroli wewnętrznej w formacie stabilizowanym	Przezroczysty czerwona folia	2 woreczki po 12 probówek
VS-RB05	Probówka z buforem do rehydratacji	Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu	Przezroczysty fioletowa folia	1 woreczek po 24 probówki

Tabela 1. Odczynniki i materiały dostarczane z VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywisty (kod VS-ABR124).



5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: system BD MAX™.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (kod: 442828)
- Wkłady do PCR BD MAX™ (kod: 437519)
- Wirówka.
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Końcówki z filtrem
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe

6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Chronić elementy przed światłem słonecznym.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Do stosowania w diagnostyce in vitro przez fachowy personel.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy



przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.

- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W miejscu przeprowadzania testu nie należy jeść, pić ani palić tytoniu. Po zakończeniu testu należy umyć ręce.
- Próbkę należy traktować jako potencjalnie zakaźną, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, przetwarzania i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

8. Procedura testowa

8.1. POBIERANIE, PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT PRÓBEK

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym został zweryfikowany w odniesieniu do wymazów z gardła uzyskanych za pomocą elastycznych nylonowych wymazówek do pobierania próbek z nosa i gardła, umieszczonych niezwłocznie na podłożu transportowym dla próbek do oznaczania wirusów (Viracell, Hiszpania). Według piśmiennictwa, możliwe jest testowanie dodatkowych próbek z dróg oddechowych pobranych od pacjentów z objawami (tzn. wymazów z nosa, z jamy nosa, nosogardzieli, łączonych wymazów z nosa i gardła, aspiratów z nosogardzieli, nosa, tchawicy, popłuczyn z nosogardzieli, nosa, gardła, materiału z płukania oskrzelowo-płucnego, płwociny), ale konieczna jest weryfikacja przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się w warunkach zweryfikowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi odbywać się zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 24 godziny) zalecamy przesyłanie w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Próbkę można przechowywać w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 24 godziny lub zamrozić w temperaturze -20°C lub -70°C w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiec degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

8.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBK I EKSTRAKJA RNA

Dokonać przygotowania próbki zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Pobrać pipetą 200–400 μl próbki klinicznej z dróg oddechowych do probówki z buforem BD MAX™ TNA-3 i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę.



2. Przejść do obsługi systemu BD MAX™.

8.3. PROTOKÓŁ PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym, można pominąć etap 8.3.1 i przejść bezpośrednio do 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” systemu BD MAX™ wybrać zakładkę „Test Editor”.
- 2) Kliknąć przycisk „Create”.
- 3) W oknie „Test Name” wpisać nazwę swojego testu, np. VIASURE *Flu A, Flu B & RSV*.
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” wybrać „Type 5”
 - b. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem Viasure dla BD MAX. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)”.
- 6) W „Sample extraction parameters” wybrać „User defined” i dopasować objętość próbki do objętości użytej próbki klinicznej, dodając 550 µl.
 - a. Przykład: W przypadku przeniesienia pipetą 200 µl próbki klinicznej z dróg oddechowych do próbówki z buforem BD MAX TNA-3, należy wstępnie ustawić parametr na 750 µl.
 - b. Uwaga: maksymalna wartość, jaką można ustawić, to 950 µl.
- 7) W „Ct Calculation” wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W zakładce „PCR settings” wpisać następujące parametry: „Channel Settings”, „Gains” oraz „Threshold” (Tabela 2).
 - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem Viasure dla BD MAX. W takiej sytuacji Ustawienia PCR i Etapy testu należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

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

Tabela 2. Ustawienia PCR

- 9) W zakładce „PCR settings” wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Tabela 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	-

Tabela 3. Parametry „Spectral cross-talk”

- 10) W zakładce „Test Steps” wpisać protokół PCR (Tabela 4)

Nazwa etapu	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	✓

Tabela 4. Protokół PCR

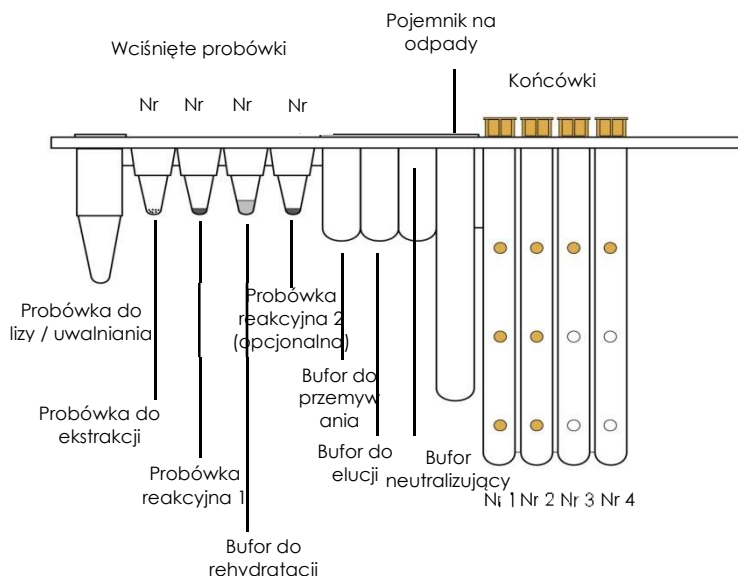
- 11) Kliknąć przycisk „Save test”.

8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi, należy wyjąć jeden indywidualny pasek odczynnikowy (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3. Delikatnie uderzyć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie probówek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™.
- Wyjąć potrzebną liczbę probówek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć probówkę (probówki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- Określić i oddzielić odpowiednią liczbę probówek reakcyjnych VIASURE Flu A, Flu B & RSV (czerwona folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)
 - Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia.
 - Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Punkt 8.3.1), należy określić i oddzielić odpowiednią liczbę dodatkowych probówek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
- Wyjąć potrzebną liczbę probówek z buforem do rehydratacji (fioletowa folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.



- a. Aby prawidłowo przeprowadzić transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia.



Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3.

8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać zakładkę „Work list” na ekranie „Run” oprogramowania systemu BD MAX™ w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE Flu A, Flu B & RSV (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny próbówki z buforem próbki do okna „Sample tube” w ramach „Worklist”, skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta w oknie „Accession” w ramach „Worklist” (w stosownych przypadkach) i kliknąć przycisk „Save”. Kontynuować aż do wpisania wszystkich próbek z buforem próbki. Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz probówki z buforem próbki zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną próbkę z buforem próbki w statywie (statywach) BD MAX™.
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR do systemu BD MAX™.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™.
- 10) Kliknąć „Start Run”, aby rozpocząć procedurę.

8.3.5 Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results”.
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View”.
- 3) Kliknąć „Print”, wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...”
- 4) Kliknąć „Print or Export button” na ekranie „Run Reports”



9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 4). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 5.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™.

Za pomocą poniższej tabeli należy odczytać i przeanalizować wyniki:

Grypa typu A (475/520)	Grypa typu B (585/630)	RSV (630/665)	Kontrola wewnętrzna (530/565)	Interpretacja
-	-	-	+	Grypa typu A, Grypa typu B i RSV ujemny
+	+	+	+/-	Grypa typu A, Grypa typu B, RSV dodatni
+	-	-	+/-	Grypa typu A dodatni, Grypa typu B i RSV ujemny
+	+	-	+/-	Grypa typu A i grypa typu B dodatni, RSV ujemny
+	-	+	+/-	Grypa typu A i RSV dodatni, Grypa typu B ujemny
-	+	-	+/-	Grypa typu B dodatni, Grypa typu A i RSV ujemny
-	+	+	+/-	Grypa typu B i RSV dodatni, Grypa typu A ujemny
-	-	+	+/-	RSV dodatni, Grypa typu A i Grypa typu B ujemny
-	-	-	-	Nierozstrzygający
UNR	UNR	UNR	UNR	Wynik nierozstrzygający (UNR) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji
IND	IND	IND	IND	Nieokreślony wynik oznaczenia (IND). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.
INC	INC	INC	INC	Niepełny wynik oznaczenia (INC). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń

Tabela 5. Interpretacja próbek
 +: Krzywa amplifikacji
 -: Brak krzywej amplifikacji



Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Kontrola wewnętrzna może wykazywać sygnał amplifikacji lub nie, ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej zamiast kontroli wewnętrznej. W tych wypadkach wykrywanie IC nie jest konieczne.

Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia. Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej.

W przypadku wyników nierozstrzygujących, braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce, która dała wynik ujemny, zalecamy powtórzenie próby przy rozcieńczeniu próbki w stosunku 1:10 w celu sprawdzenia pod kątem ewentualnych problemów z hamowaniem.

10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Chociaż ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów z gardła.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego RNA z próbek klinicznych. Niewłaściwe pobranie, przechowywanie i (lub) transport próbek może spowodować uzyskanie wyników fałszywie dodatnich.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez grypę typu A, grypę typu B i (lub) RSV którejkolwiek próbki zawierającej wysokie stężenia docelowej sekwencji RNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Wyniki uzyskane przy użyciu zestawu VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit mogą wymagać ponownego wykonania testu, jeżeli są nierozstrzygujące (UNR) — w sytuacji, gdy próbka zawiera inhibitory albo miała miejsce nieprawidłowa rehydratacja w próbówce liofilizowaną mieszaniną reakcyjną, nieokreślone (IND) albo niepełne (INC) — w sytuacji, gdy wystąpiła awaria urządzenia.

11. Kontrola jakości

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym zawiera kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej próbówce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

12. Charakterystyka wydajnościowa

12.1. Czulość i swoistość kliniczna



Wydajność kliniczną VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym badano za pomocą 344 próbek z dróg oddechowych (wymazów z gardła) pobranych od pacjentów z objawami. Wyniki te porównano z wynikami uzyskanymi za pomocą metod detekcji molekularnej (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Uzyskano następujące wyniki:

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

Tabela 6. Wyniki porównawcze dla grypy typu A.

Zgodność wyników dodatnich wyniosła >98%, a zgodność wyników ujemnych wyniosła >96%.

*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody.

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

Tabela 7. Wyniki porównawcze dla grypy typu B.

Zgodność wyników dodatnich wyniosła >96%, a zgodność wyników ujemnych wyniosła >99%..

*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody

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

Tabela 8. Wyniki porównawcze dla wirusa RSV

Zgodność wyników dodatnich wyniosła >84%, a zgodność wyników ujemnych wyniosła >99%..

*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody

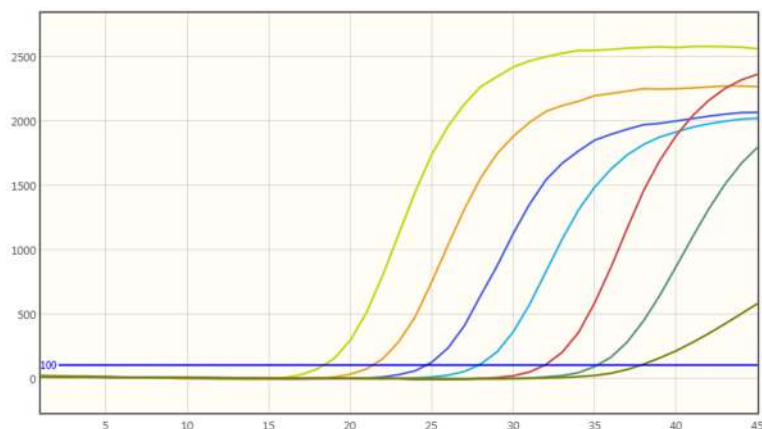


Te wyniki wykazują wysoką czułość i swoistość w zakresie wykrywania wirusów grypy typu A, grypy typu B i (lub) RSV za pomocą VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym.

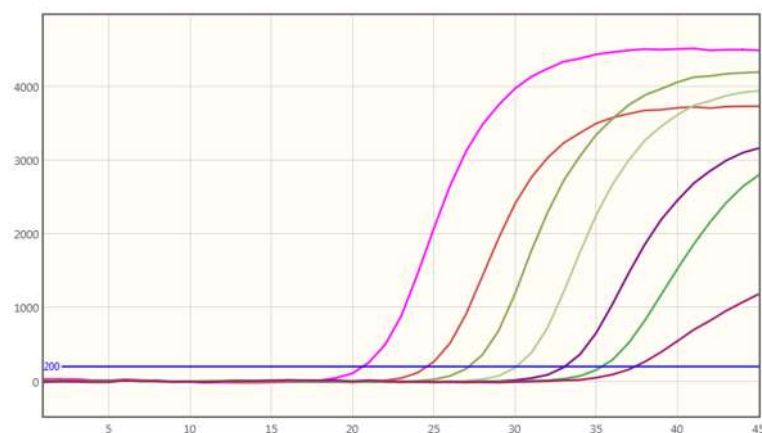
12.2. Czułość analityczna

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit rzeczywistym wykazuje granicę wykrywania wynoszącą ≥ 10 kopii RNA na reakcję dla grypy typu A, grypy typu B i RSV z częstością wyników dodatnich wynoszącą $\geq 95\%$ (Rysunek 2, 3 i 4).

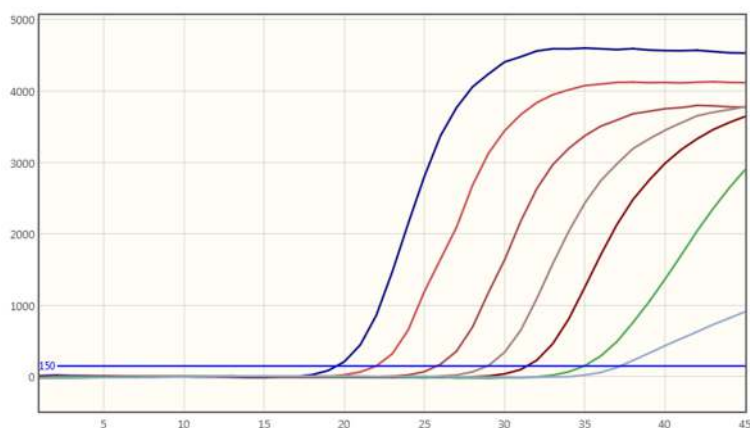
Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy grypy typu A ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ kopii/reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 475/520 (FAM)).



Rysunek 3. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy grypy typu B ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ kopii/reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 585/630 (ROX)).



Rysunek 4. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy RSV ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^0$ kopii/reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 630/665 (Cy5)).



12.3. Swoistość analityczna

Swoistość wykrywania grypy typu A, grypy typu B oraz RSV potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów reprezentujących najczęściej występujące patogeny zakażeń dróg oddechowych.

Nie wykryto reaktywności krzyżowej między żadnym z następujących mikroorganizmów z wyjątkiem patogenów docelowych w każdym teście.

Test reaktywności krzyżowej.					
<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	-/+		

Tabela 9. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.



12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym oceniano co do wykrywania grypy typu A w odniesieniu do szczepów: 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) i A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, wykazując wyniki dodatnie.

Reaktywność VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym oceniano co do wykrywania grypy typu B w odniesieniu do szczepów: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 i B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016, wykazując wyniki dodatnie.

Reaktywność VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit rzeczywistym oceniano co do wykrywania ludzkiego wirusa syncytialnego dróg oddechowych (RSV A i B), wykazując wyniki dodatnie.

13. 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. Symbole dla elementów i odczynników IVD

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Urządzenie do diagnostyki w warunkach <i>in vitro</i>		Keep dry Przechowywać w suchym miejscu		Use by Użyć przed		Manufacturer Producent	 LOT	Batch code Kod serii
	Consult instructions for use Zapoznać się z instrukcją obsługi.		Temperature limitation Ograniczenie temperatury		Contains sufficient for <n> test Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów		DIL	 REF	Catalogue number Numer katalogowy
							Sample diluent Rozcieńczalnik próbki		

BD MAX™ jest zarejestrowanym znakiem handlowym firmy 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