

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Handbok för följande referenser:

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™/
för användning 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 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. 4)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.

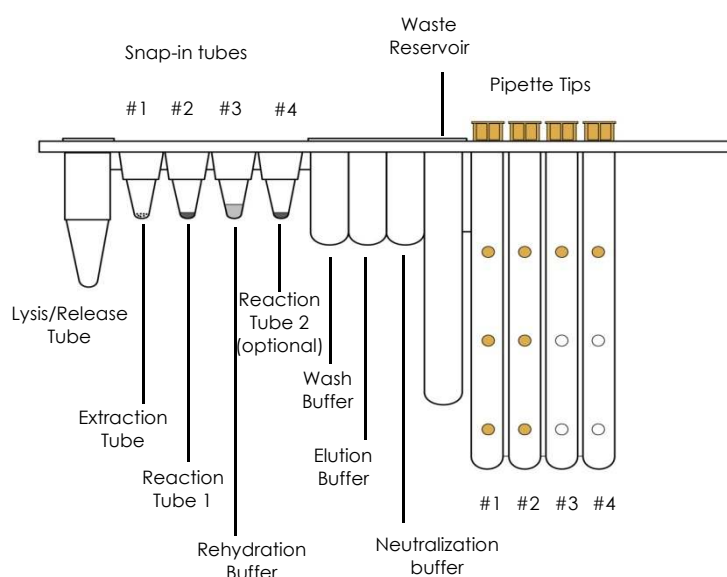


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

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 curve

-: No amplification curve

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

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with throat swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.



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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

The results were as follows:

VIASURE <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.

12.2. 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).

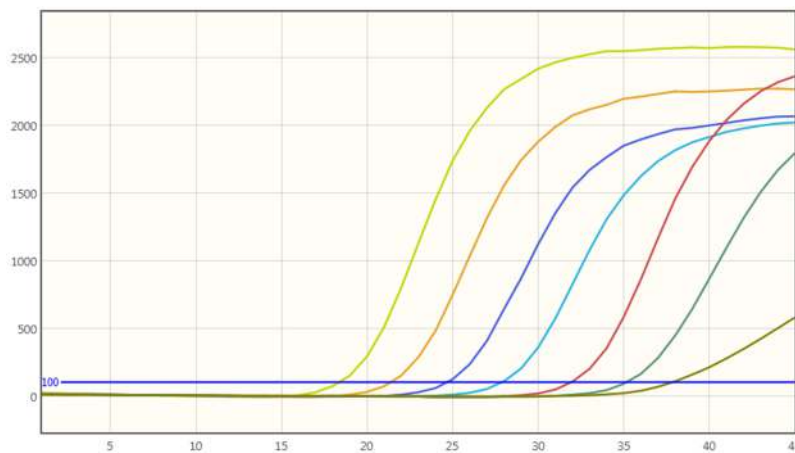


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

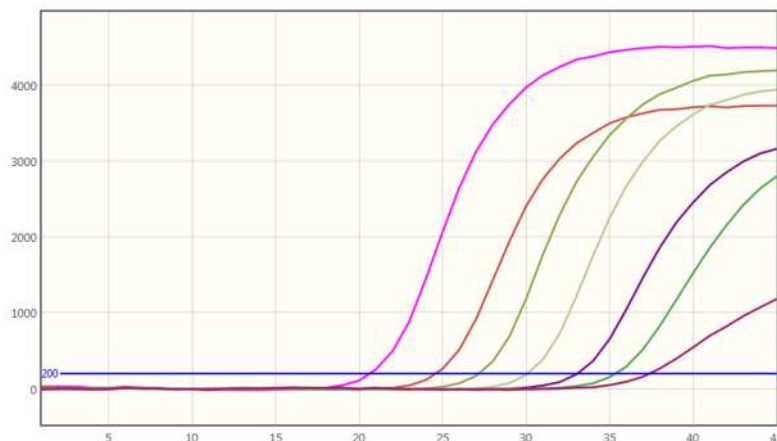
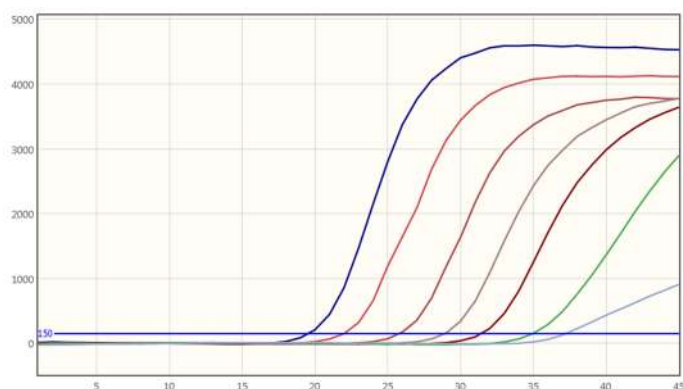


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

12.3. 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/Reihenente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Enterovirus Echovirus types 11 and 30	-	A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Human metapneumovirus A and B	-	A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV)	-/+
Human coronavirus 229E	-	A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



12.4. 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



SVENSKA

1. Avsedd användning

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit är avsett för specifik identifiering och differentiering av influensa A, influensa B (Flu A och/eller B) och/eller humant respiratoriskt syncytialvirus (RSV) i luftvägsprover från patienter med tecken och symtom på luftvägsinfektion. Detta test är avsett att användas som hjälp vid diagnos av influensa A, influensa B och/eller RSV i kombination med kliniska och epidemiologiska riskfaktorer. I analysen används BD MAX™-systemet för extraktion av RNA och efterföljande realtids-RT-PCR med de medföljande reagenserna i kombination med universalreagenser och engångsmaterial för BD MAX™-systemet. RNA från kliniska prover detekteras med prober med ett fluorescerande färgämne som är specifikt för influensa A, influensa B och RSV.

2. Sammanfattning och förklaring

Influensavirus tillhör familjen *Orthomyxoviridae* och orsakar de flesta virusinfektioner i de nedre luftvägarna. Influensa A och B är en betydande orsak till morbiditet och mortalitet över hela världen, med tanke på att äldre och personer med nedsatt immunförsvar löper särskilt hög risk att utveckla svår sjukdom och allvarliga komplikationer, till exempel lunginflammation. Människor upplever några eller samtliga av dessa symtom: feber eller feberkänsla/frossa, hosta, halsont, nästäppa och snuva, muskelvärk, huvudvärk och anorexi. Influensavirus kan spridas från person till person på två olika sätt: genom luften (stora droppar och aerosoler från nysningar och hostningar), och genom direkt eller indirekt kontakt.

Influensa A och B är höljade, enkelsträngade RNA-virus som innehåller åtta segmenterade strängar av genom-RNA, som vanligtvis kodar 11 eller 12 virusproteiner. Det virala höljet, som härrör från värdens plasmamembran, består av ett lipiddubbellager som innehåller transmembranproteiner, till exempel hemagglutinin (HA) och neuraminidas (NA), och matrixproteinerna M1 och M2. Influensa A-virus klassificeras vidare i subtyper baserat på antigeniciteten hos deras "HA"- och "NA"-molekyler, medan influensa B är indelat i 2 stammar med olika antigen- och gensammansättning: Victoria och Yamagata.

Humant respiratoriskt syncytialvirus (RSV) tillhör familjen *Paramyxoviridae* och är det främsta viruset vid akuta luftvägsinfektioner. RSV är ett höljat, icke-segmenterat, negativt, enkelsträngat linjärt RNA-genomvirus. Respiratoriskt syncytialvirus är en vanlig bidragande faktor vid luftvägsinfektioner som orsakar bronkit, lunginflammation och kroniska obstruktiva luftvägsinfektioner hos människor i alla åldrar. Människor upplever ofta några eller samtliga av dessa symtom: rinnsnuva, låg feber, hosta, halsont, huvudvärk och pipande andning. RSV överförs via stora droppar med sekret från nasofarynx från infekterade personer, vid närkontakt eller genom inokulering efter att ha rört vid kontaminerade ytor.

Diagnostisering kan vara problematiskt, eftersom en lång rad patogener kan orsaka akuta luftvägsinfektioner med liknande kliniska symtom. Realtids-PCR-analyser har visat sig vara ett känsligt och specifikt diagnosverktyg för detektion av influensa A-, influensa B- och RS-virus.



3. Principer för metoden

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit är avsett för diagnos av influensa A, influensa B och/eller RSV i luftvägsprover. Detektionen görs i ett realtids-RT-format i ett steg där den omvända transkriptionen och den efterföljande amplifieringen av den specifika målsekvensen sker i samma reaktionsrör. Det isolerade RNA-målet transkriberas vilket skapar komplementärt DNA genom omvänd transkriptas som följs av amplifiering av en konserverad region av *M1*-genen för influensa A och influensa B och en konserverad region av *N*-genen för RSV med specifika primrar och fluorescensmärkta prober.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit baseras på 5'-exonukleasaktiviteten hos DNA-polymeras. Under DNA-amplifiering klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen, vilket separerar inhiberarfärgämnet från rapportören. Denna reaktion skapar en ökning i fluorescenssignalen som är proportionerlig i förhållande till mängden målmall. Denna fluorescens kan mätas med BD MAX™-systemet.

Varje rör i VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit innehåller alla de komponenter som behövs för realtids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTPS, buffert, polymeras, omvänd-transkriptas) i ett stabiliserat format, samt en intern kontroll för att övervaka PCR-inhibering. Mål för influensa A-RNA amplifieras och detekteras i kanal 475/520, influensa B-RNA i kanal 585/630, RSV-RNA i kanal 630/665 och den interna kontrollen (IC) i kanal 530/565.

4. Tillhandahållna reagenser

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit innehåller följande material och reagenser som beskrivs i tabell 1:

Referens	Reagens/material	Beskrivning	Färg	Mängd
VS-ABR212R	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> -reaktionsrör	En blandning av enzymer, primrar, prober, buffert, dNTPs, stabiliserare och intern kontroll i stabiliserat format	Transparent röd folie	2 påsar med 12 rör
VS-RB05	Rör med rehydreringsbuffert	Lösning för att rekonstituera den stabiliserade produkten	Transparent lila folie	1 påse med 24 rör

Tabell 1. Reagenser och material som tillhandahålls i VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit med ref. VS-ABR124.

5. Reagenser och utrustning som tillhandahålls av användaren

I listan nedan beskrivs material och utrustning som krävs med som inte medföljer i VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit.

- Instrument för realtids-PCR: BD MAX™-systemet
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (ref.: 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (PCR-kassetter) (ref.: 437519)
- Vortexblandare
- Mikropipetter (exakt område mellan 2 och 1 000 µL)



- Filterspetsar
- Nitrilhandskar

6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Kiten kan transporteras och förvaras i 2–40 °C till det utgångsdatum som anges på etiketten.
- Skydda komponenterna från solljus.

7. Försiktighetsbeaktanden för användare

- Avsett för professionell in vitro-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller material.
- Använd inte kitet om etiketten som förseglar ytterkartongen är bruten.
- Använd inte reagenserna om skyddslådan är öppen eller trasig vid mottagandet.
- Använd inte reagenserna om skyddspåsarna är öppna eller trasiga vid mottagandet.
- Använd inte reagenserna om torkmedel saknas eller är trasigt inuti reagenspåsarna.
- Ta inte bort torkmedlet ur reagenspåsarna.
- Förslut reagensskyddspåsarna med blixtlåset omedelbart efter varje användning. Tryck ut eventuell överflödig luft ur påsarna innan de försluts.
- Använd inte reagenserna om folien har öppnats eller skadats.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller kit eller loter.
- Skydda reagenserna mot fukt. Långvarig exponering för fukt kan påverka produktens prestanda.
- I fall där andra PCR-tester också utförs i samma allmänna område i laboratoriet måste försiktighet iakttas för att säkerställa att VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3-extraktionskitet, eventuella övriga reagenser som behövs för testningen och BD MAX™-systemet inte kontamineras. Handskar måste bytas innan reagenser och kassetter hanteras.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det ska starta i extraktionsområdet och sedan fortsätta till amplifierings- och detektionsområdet. För inte tillbaka prover, utrustning och reagenser till det område där ett tidigare steg har utförts.
- Iaktta god laboratoriesed. Använd skyddskläder och engångshandskar, skyddsglasögon och munskydd. Ät, drick eller rök inte inom arbetsområdet. Tvätta händerna när du är klar med testet.
- Såväl proverna som alla reagenser och allt material som varit i kontakt med proverna måste betraktas som potentiellt smittsamma och hanteras i enlighet med nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder under insamling, förvaring, hantering och kassering av prover.
- Regelbunden dekontaminering av ofta använd utrustning rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för ytterligare varningar, försiktighetsbeaktanden och förfaranden.



8. Testförfarande

8.1. PROVTAGNING, FÖRVARING OCH TRANSPORT

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit har validerats för pinnprover från svalg som erhöles med flexibla nylonflockade provpinnar från nasofarynx, som omedelbart placerats i ett virustransportmedium (Viracell, Spanien). Ytterligare luftvägsprover från symtomatiska patienter kan testas enligt litteraturen (dvs. pinnprover från yttre eller inre delen av näshålan eller nasofarynx, kombinerat näs- och svalgpinnprov, aspirat från nasofarynx/näsa/luftstrupe, sköljningar från nasofarynx/näsa/svalg, bronkoalveolära lavageprover, sputum), men måste valideras av användaren.

Provtagning, förvaring och transport av prover ska ske enligt de villkor som validerats av användaren. Överlag ska luftvägsprover tas och märkas på lämpligt sätt i rena behållare med eller utan transportmedium (beroende på provtyp), och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Proverna måste transporteras enligt lokala och nationella bestämmelser för transport av patogener. Vid långvarig transport (över 24 timmar) rekommenderar vi att materialet transporteras i $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Proverna kan förvaras i $2-8^{\circ}\text{C}$ i upp till 24 timmar eller frysta i -20°C eller -70°C för konservering. Upprepade cykler med frysning och upptining ska undvikas för att förhindra att provet och nukleinsyror bryts ned.

8.2. PROVBEREDNING OCH RNA-EXTRAKTION

Utför provberedningen enligt de rekommendationer som finns i bruksanvisningen för det extraktionskit som används, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Observera att vissa andra prover kan behöva förbehandlas. Beredningsförfaranden för extraktion för det aktuella användningsområdet ska tas fram och valideras av användaren.

1. Pipettera 200–400 μL av ett kliniskt luftvägsprov i ett BD MAX™ TNA-3-provbuffertrör och förslut röret med ett membranlock. Säkerställ att provet blandas ordentligt genom att vortexblanda det vid hög hastighet under 1 minut.
2. Fortsätt till att använda BD MAX™-systemet.

8.3. PCR-PROTOKOLL

Obs! Se BD MAX™-systemets användarhandbok för detaljerade anvisningar.

8.3.1. Skapa ett PCR-testprogram för VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit

Obs! Om du redan har skapat VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection-testet kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på skärmen "Run" (Körning) i BD MAX™-systemet.
- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Skriv in namnet på testet i fönstret "Test Name" (Testets namn): dvs. VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV*.
- 4) Välj "ExK TNA-3" i den nedrullningsbara menyn "Extraction Type" (Extraktionstyp).



- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i den nedrullningsbara menyn "Master Mix Format" (Master Mix-format). Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare Viasure-test för BD MAX, välj sedan "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel Master Mix koncentrerad frystorkad MM med rehydreringsbuffert (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierade) under "Sample Extraction Parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till volymen på det kliniska prov som används plus 550 µL.
 - a. Exempel: Om 200 µL av ett kliniskt luftvägsprov pipetteras i ett BD MAX TNA-3-provbuffertrör anges parametern till 750 µL.
 - b. Obs! Den högsta inställningen är 950 µL.
- 7) Ange "Call Ct at Threshold Crossing" (Anropa CT när tröskelvärdet korsas) i "Ct Calculation" (CT-beräkning).
- 8) På fliken "PCR Settings" (PCR-inställningar) anger du följande parametrar: "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkning) och "Threshold" (Tröskel) (tabell 2).
 - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare Viasure-test för BD MAX, och PCR-inställningar och teststeg ska slutföras för snap-in-positionerna 2 (grön) och 4 (blå).

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

Tabell 2. PCR-inställningar.

- 9) På fliken "PCR Settings" (PCR-inställningar) anger du även följande parametrar för "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) (tabell 3):

		False Receiving Channel (Kanal med falsk mottagning)				
Excitation Channel (Excitationskanal)	Channel (Kanal)	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	-

Tabell 3. Parametrar för spektral överhörning.



10) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 4).

Step Name (Stegets namn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Cykler)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektera)
Reverse transcription (Omvänd transkription)	Hold (Paus)	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Initial denaturering)	Hold (Paus)	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering och härdning/förlängning (datainsamling)).	2 – Temperature (Temperatur)	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

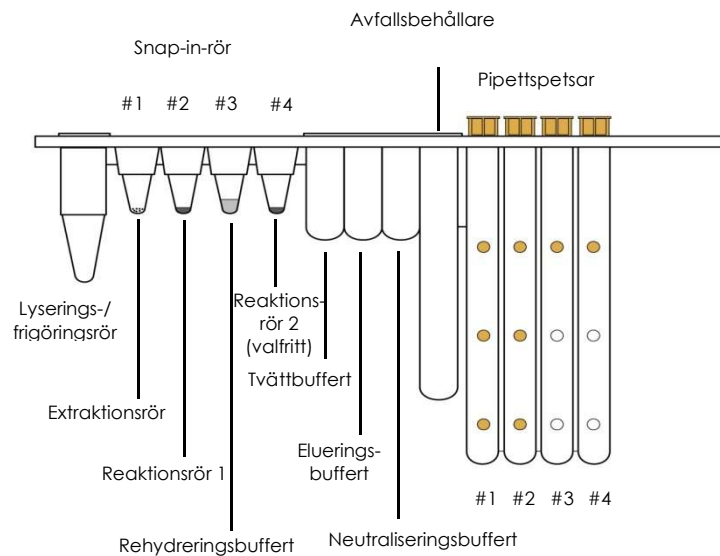
Tabell 4. PCR-protokoll.

11) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).

8.3.2. Förberedelse av BD MAX™-ställ

- 1) Ta ur en sammansatt reagensremsa (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) från BD MAX™ ExK TNA-3-kitet för varje prov som ska testas. Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor ligger på rörens botten och ladda den i BD MAX™-systemets provställ.
- 2) Ta ut det antal BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (extraktionsrör) (B4) (vit folie) som behövs ur skyddspåsen. Snäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner i TNA-reagensremsan (snap-in-position 1, vit färgkodning på stället. Se figur 1). Tryck ut överflödigt luft och förslut påsen med blixtlåset.
- 3) Fastställ och separera lämpligt antal VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV*-reaktionsrör (röd folie) och snäpp fast dem på motsvarande positioner i remsan (snap-in-position 2, grön färgkodning på stället. Se figur 1).
 - a. Tryck ut överflödigt luft och förslut aluminiumpåsarna med blixtlåset.
 - b. Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen.
 - i. Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel Master Mix koncentrerad frystorkad MM med rehydreringsbuffert (typ 5) (avsnitt 8.3.1): fastställ och separera lämpligt antal ytterligare VIASURE-reaktionsrör (annan folie) och snäpp fast dem på motsvarande position i remsan (snap-in-position 4, blå färgkodning på stället. Se figur 1). Tryck ut överflödigt luft och förslut aluminiumpåsarna med blixtlåset.
- 4) Ta bort det antal rör med rehydreringsbuffert som krävs (lila folie) och snäpp fast dem på motsvarande positioner i remsan (snap-in-position 3, ingen färgkodning på stället. Se figur 1). Tryck ut överflödigt luft och förslut påsen med blixtlåset.
 - a. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen.





Figur 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) (reagensremsa) från BD MAX™ ExK TNA-3-kitet.

8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrumentet

- 1) Öppna fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Körning) i BD MAX™ systemet programvaruversion v4.50A eller senare.
- 2) Välj VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV i den nedrullningsbara menyn "Test" (om det inte redan skapats, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Markera det aktuella kit-lotnumret (finns på ytterkartongen till det extraktionskit som används) på den nedrullningsbara menyn (valfritt).
- 4) Ange ID för provbuffertröret i fönstret Sample Tube (Provrör) i Worklist (Arbetslista), antingen genom att skanna streckkoden med skannern eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i Specimen/Patient ID (Prov-/patient-ID) i fönstret Accession (Labnummer) i Worklist (Arbetslista) (om tillämpligt) och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla provbuffertrör har angetts. Säkerställ att prov-/patient-ID och provbuffertrören matchas korrekt.
- 6) Placera det beredda provbuffertröret i BD MAX™-stället/-ställen.
- 7) Ladda stället/ställen i BD MAX™-systemet (ställ A är placerat på vänster sida i BD MAX™-systemet och ställ B på höger sida.)
- 8) Sätt in det antal BD MAX™ PCR Cartridges (PCR-kassetter) som behövs i BD MAX™-systemet.
- 9) Stäng luckan till BD MAX™-systemet.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att starta processen.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) På huvudmenyn klickar du på knappen "Results" (Resultat).
- 2) Högerklicka på körningen i listan eller tryck på knappen "view" (visa).
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details" (Körningsdetaljer), "Test Details" (Testinformation) och "Plot" (Kurva).
- 4) Klicka på knappen "Print" (Skriv ut) eller "Export" (Exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapporter).



9. Tolkning av resultat

En detaljerad beskrivning av hur data ska analyseras finns i BD MAX™-systemets användarhandbok.

Analysen av data görs av BD MAX™-programmet enligt tillverkarens instruktioner. BD MAX™-programmet rapporterar CT-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje prov som testas på följande sätt:

- CT-värdet 0 indikerar att inget CT-värde med det angivna tröskelvärde beräknades av programmet (se tabell 4). Amplifieringskurvan för provet som visar CT-värdet "0" måste kontrolleras manuellt.
- CT-värdet -1 indikerar att ingen amplifieringsprocess har skett.
- Annat CT-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och i enlighet med de riktlinjer för tolkning som beskrivs i tabell 5.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att verifiera att amplifieringsmixen fungerar korrekt. Kontrollera dessutom att det inte föreligger något rapporterat BD MAX™-systemfel.

Läs av och analysera resultaten med hjälp av följande tabell:

Influensa A (475/520)	Influensa B (585/630)	RSV (630/665)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
-	-	-	+	Negativ för influensa A, B och RSV
+	+	+	+/-	Positiv för influensa A, B och RSV
+	-	-	+/-	Positiv för influensa A, negativ för influensa B och RSV
+	+	-	+/-	Positiv för influensa A och B, och negativ för RSV
+	-	+	+/-	Positiv för influensa A och RSV, och negativ för influensa B
-	+	-	+/-	Positiv för influensa B, negativ för influensa A och RSV
-	+	+	+/-	Positiv för influensa B och RSV, negativ för influensa A
-	-	+	+/-	Positiv för RSV, negativ för influensa A och B
UNR	UNR	UNR	UNR	Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller amplifieringen.
IND	IND	IND	IND	Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod.
INC	INC	INC	INC	Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras.

Tabell 5. Tolkning av resultat

+: Amplifieringskurva

-: Ingen amplifieringskurva

Ett prov anses som positivt om CT-värdet som erhållits är mindre än 40. En amplifieringssignal kanske visas eller inte visas för den interna kontrollen, eftersom ett högt antal kopior för målet kan orsaka amplifiering av företrädesvis



målspecifika nukleinsyror i stället för den interna kontrollen. I de här fallen är detektion av den interna kontrollen inte nödvändig.

Ett prov anses som negativt om provet inte visar någon amplifieringssignal i detektionssystemet men den interna kontrollen är positiv. Inhibering av PCR-reaktionen kan uteslutas genom amplifieringen av den interna kontrollen.

Vid olösta resultat med frånvaro av intern kontrollsignal i negativa prover rekommenderar vi att analysen upprepas med provet utspädd 1:10 för att kontrollera om det finns eventuella inhiberingsproblem.

10. Testets begränsningar

- Resultaten av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal i kombination med anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om den här analysen kan användas tillsammans med andra typer av prover har den validerats med pinnprover från svalg.
- Kvaliteten på testet beror på kvaliteten av provet: lämpligt RNA från kliniska prover måste extraheras. Felaktig provtagning, förvaring och/eller transport av prover kan ge falskt negativa resultat.
- Extremt låga nivåer av målet under detektionsgränsen kan detekteras, men resultaten kanske inte är reproducerbara.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av influensa A, influensa B och/eller RSV, antingen på grund av att proverna innehåller höga koncentrationer av mål-RNA eller på grund av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- Resultaten som erhålls med VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit kan vara Olösta på grund av förekomsten av inhibitorer i provet eller felaktig rehydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning, eller så kan de vara Obestämda eller Ofullständiga på grund av instrumentfel. Testningen behöver utföras på nytt i dessa fall.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit innehåller en intern kontroll (IC) i respektive reaktionsrör som bekräftar att tekniken fungerar korrekt.

12. Kliniska prestanda

12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

Kliniska prestanda för VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit testades med 344 luftvägsprover (pinnprover från svalg) från patienter med symtom. Dessa resultat jämfördes med de som erhöles med en molekylär detektionsmetod (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Resultaten blev följande:



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

Tabell 6. Jämförelse av resultat för influensa A.

Den positiva procentuella överensstämmelsen är >98 % och den negativa procentuella överensstämmelsen är >96 %.

*Den låga mängden mall-RNA i det här luftvägsprovet är lägre än detektionsgränsen för den använda metoden.

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

Tabell 7. Jämförelse av resultat för influensa B.

Den positiva procentuella överensstämmelsen är >96 % och den negativa procentuella överensstämmelsen är >99 %.

*Den låga mängden mall-RNA i det här luftvägsprovet är lägre än detektionsgränsen för den använda metoden.

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

Tabell 8. Jämförelse av resultat för RSV.

Den positiva procentuella överensstämmelsen är >84 % och den negativa procentuella överensstämmelsen är >99 %.

*Den låga mängden mall-RNA i det här luftvägsprovet är lägre än detektionsgränsen för den använda metoden.

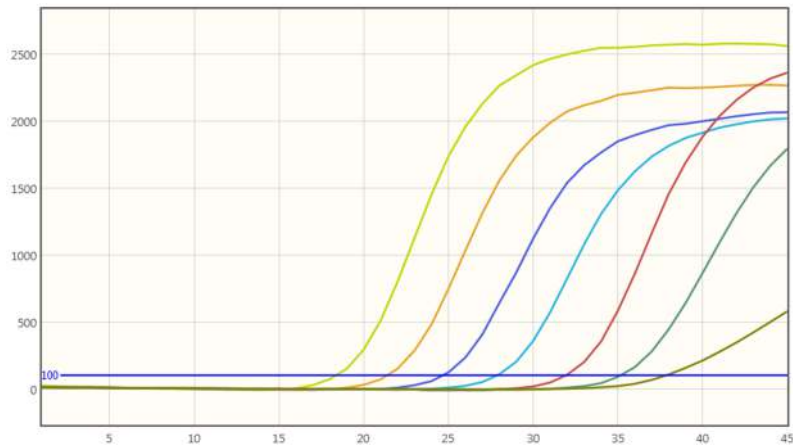
Resultaten visar en hög sensitivitet och specificitet för att detektera influensa A-, influensa B- och/eller RS-virus med VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit.



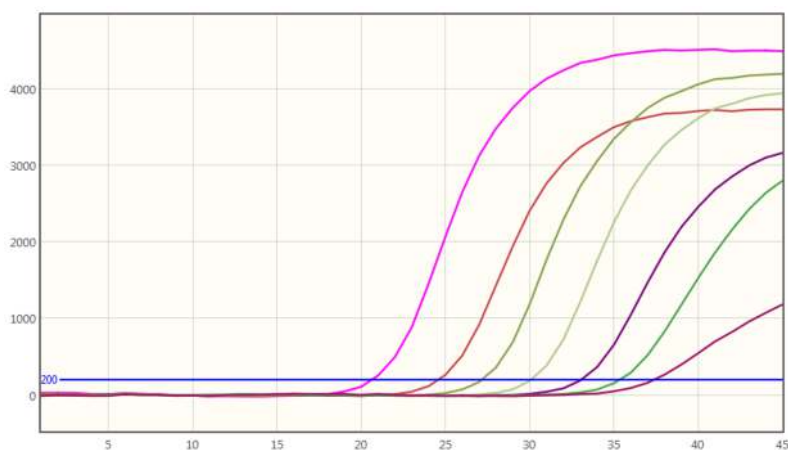
12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit har en detektionsgräns på ≥ 10 RNA-kopior per reaktion för influensa A, influensa B och RSV med en positiv frekvens på $\geq 95\%$ (figur 2, 3 och 4).

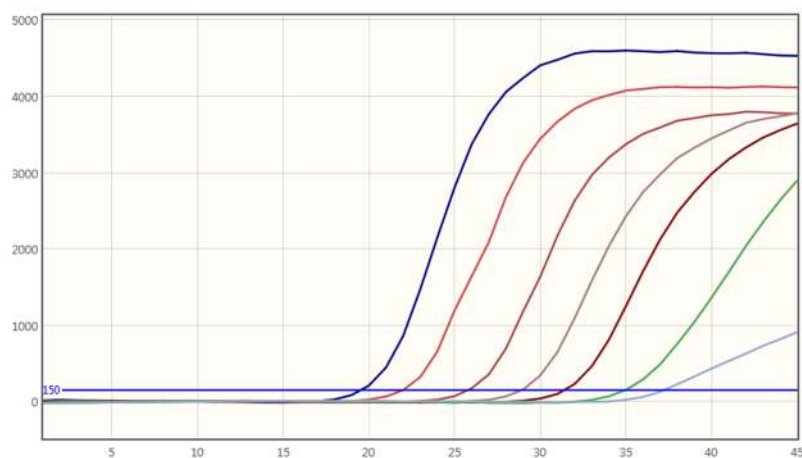
Figur 2. Utspädningsserie för influensa A-mall ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ kopior/rxn) som körts på BD MAX™-systemet (kanalen 475/520 (FAM)).



Figur 3. Utspädningsserie för influensa B-mall ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ kopior/rxn) som körts på BD MAX™-systemet (kanalen 585/630 (ROX)).



Figur 4. Utspädningsserie för RSV-mall ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^0$ kopior/rxn) som körts på BD MAX™-systemet (kanalen 630/665 (Cy5)).



12.3. Analytisk specificitet

Specificitet för influensa A-, influensa B- och RSV-analysen bekräftades genom testning av en panel som består av olika mikroorganismer som representerar de vanligaste respiratoriska patogenerna.

Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av följande testade mikroorganismer, förutom de riktade patogenerna för varje analys:

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	-/+		

Tabell 9. Patogena mikroorganismer som används som referens i den här studien.



12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten för VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit för influensa A utvärderades mot följande stammar: 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) och A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, och uppvisade positiva resultat.

Reaktiviteten för VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit för influensa B utvärderades mot följande stammar: B/Brisbane/60/2008-liknande virus (B/Victoria), B/Florida/04/06 och B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata), och B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016, uppvisade positiva resultat.

Reaktiviteten för VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit för RSV utvärderades mot humant respiratoriskt syncytialvirus (RSV A och), och uppvisade positiva resultat.

13. Bibliography/ Referenser

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 för IVD-komponenter och reagenser

	<i>In vitro</i> diagnostic device Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik		Keep dry Förvaras torrt		Use by Sista förbrukningsdatum		Manufacturer Tillverkare		Batch code Batchkod
	Consult instructions for use Se bruksanvisningen		Temperature limitation Temperaturbegränsning		Contains sufficient for <n> test Innehållet räcker till <n> tester		Sample diluent Provspädningsvätska		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.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC