VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Aşağıdaki referanslar için el kitabı:

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit **BD REF 444200**

to be used with BD MAX

BD MAX™ ile kullanılır

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 specifics 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	*Flu A, Flu B & 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 (Vircell, 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, bronchoalveolare 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 ≤-20°C. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

2. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.

2) Click the "Create" button.

3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Flu A, Flu B & RSV*.

4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".

5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"

   a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".

6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 µL.

   a. Example: If pipette 200 µL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 µL.

   b. Note: maximum setting is 950 µL.

7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".

8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).

   a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 2. PCR settings.

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

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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 4. PCR protocol.

11) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

1) For each specimen to be tested, remove one Unitized Reagent Strips (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* reaction tubes (red foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
    a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
    b. In order to carry on a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

        i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (purple foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
    a. 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.

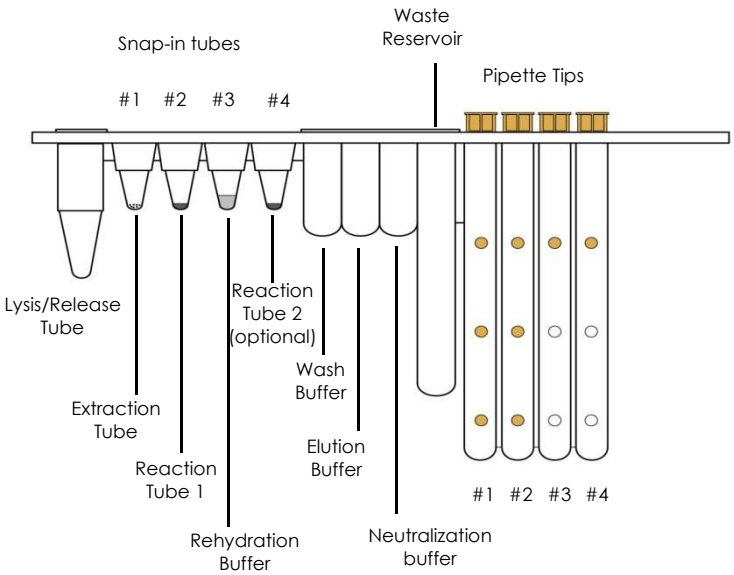


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

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 shows 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

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:

		cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-	Total
VIASURE *Flu A, B & RSV* Real Time PCR Detection kit	+	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.*

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

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 ≥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).

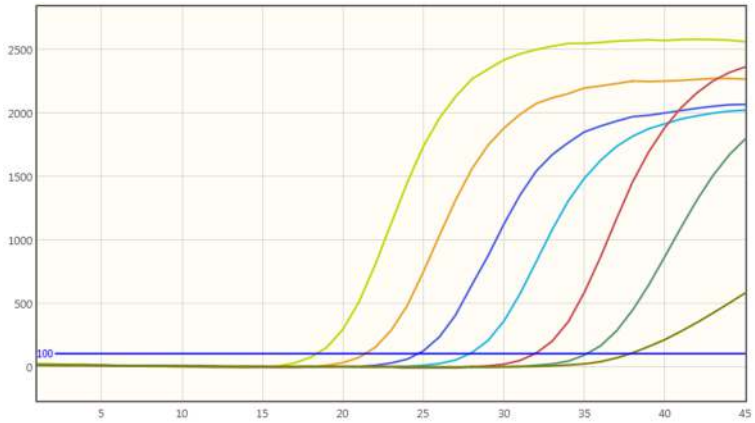


Figure 3. Dilution series of Flu B ($2*10^6$-$2*10^1$ copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

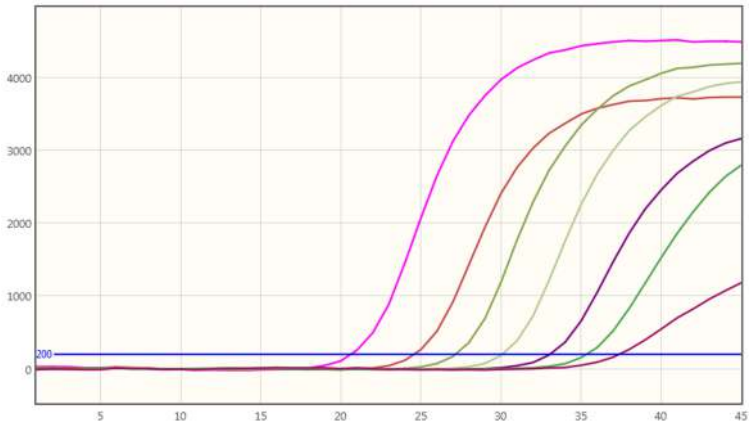
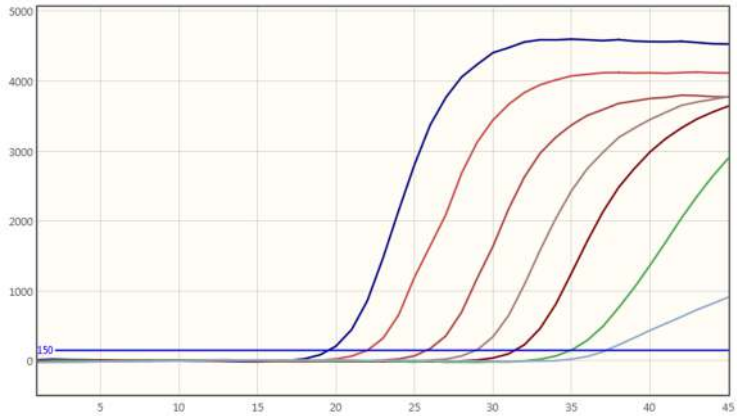


Figure 4. Dilution series of RSV ($2*10^6$-$2*10^0$ copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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					
Bordetella pertussis	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
Bordetella parapertussis	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
Legionella pneumophila	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
Mycoplasma pneumoniae	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
Streptococcus pneumoniae	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
Haemophilus influenzae MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
Moraxella catarrhalis	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
Chlamydophila pneumoniae	-	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.

TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, respiratuvar enfeksiyon işaretleri ve semptomları olan hastaların respiratuvar örneklerinde İnfluenza A, İnfluenza B (Flu A ve/veya B) ve/veya İnsan Respiratuvar Sinsitiyal Virüsünün (RSV) spesifik tanımlanması ve ayrıştırılması için tasarlanmıştır. Bu testin, klinik ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte Flu A, Flu B ve/veya RSV'nin tanısına yardımcı olacak şekilde kullanılması amaçlanmıştır. Deneyde, RNA ekstraksiyonu için BD MAX™ Sistemi ve üniversal reaktifler ve BD MAX™ sistemi için tek kullanımlık malzemelerle birlikte temin edilen reaktifleri için müteakip Gerçek Zamanlı RT-PCR kullanılmaktadır. Klinik örneklerden gelen RNA, Flu A, Flu B ve RSV'ye özgü floresan raportör boya probları kullanılarak saptanır.

2. Özet ve Açıklama

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesine aittir ve viral alt respiratuvar yolu enfeksiyonlarının çoğuna neden olur. İhtiyarların ve engelli bireylerin pnömonya gibi ciddi hastalık ve komplikasyonları geliştirme konusunda özellikle risk altında olduğu düşünülünce, influenza A ve B dünya çapında morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. İnsanlar bu semptomların bazılarını veya tümünü hisseder: ateş veya ateşi varmış gibi/ürperti hissetmek, öksürük, boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı ve akması, miyalji, baş ağrıları ve anoreksiya. İnfluenza virüsleri, kişiden kişiye iki şekilde yayılabilir: hava yoluyla (hapşurmaktan ve öksürmekten kaynaklanan büyük damlacıklar ve aerosollar) ve doğrudan veya dolaylı temasla.

İnfluenza A ve B, tipik olarak 11 veya 12 viral proteini kodlayan, sekiz segmentli genom RNA suşunu içeren zarflı, tek suşlu RNA virüsleridir. Konak plazma membranından türeyen viral zarf, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) gibi transmembran proteinlerini ve M1 ve M2 matris proteinlerini içeren lipid bir iki katmandan oluşur. İnfluenza A virüsleri "HA" ve "NA" moleküllerinin antijenikliğine göre de alt türlerde sınıflandırılır; burada İnfluenza B, Victoria ve Yamagata olmak üzere antijenik ve genetik olarak 2 ayrı soya ayrılır.

İnsan respiratuvar sinsitiyal virüsleri (RSV) *Paramyxoviridae* ailesine aittir ve akut respiratuvar enfeksiyonlarının en önemli viral ajanlarıdır. RSV zarflı, segmentlenmemiş, negatif, tek suşlu doğrusal bir RNA genom virüsüdür. Respiratuvar sinsitiyal virüs, yaygın şekilde, her yaştan insanda bronşit, pnömonya ve kronik obstrüktif pulmoner enfeksiyonlarına neden olan bir respiratuvar enfeksiyonuna yol açar. İnsanlar sıklıkla bu semptomların bazılarını veya tümünü hisseder: rinore, düşük dereceli ateş, öksürük, boğaz ağrısı, baş ağrısı ve hırıltı. RSV, enfeksiyonlu bireylerden gelen büyük nazofarengeal sekresyon damlacıkları yoluyla, yakın temasla veya kontamine yüzeylere dokunduktan sonra kendi kendine inokülasyonla iletilir.

Geniş bir patojen aralığı benzer klinik sendromlar gösteren akut respiratuvar enfeksiyonlara neden olabildiğinden, tanı sorunlu olabilir. Gerçek zamanlı PCR testlerinin, İnfluenza A, İnfluenza B ve RSV virüslerini saptamak için hassas ve spesifik bir tanı aracı olduğu gösterilmiştir.

3. İşlemin prensibi

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, respiratuvar örneklerde İnfluenza A, İnfluenza B ve/veya RSV'nin tanısı için tasarlanmıştır. Saptama, ters transkripsiyonun ve spesifik hedefli sekansın sonraki

amplifikasyonunun aynı reaksiyon tüpünde meydana geldiği, tek adımlı gerçek zamanlı bir RT formatında yapılır. İzole edilen RNA hedefi, spesifik primerler ve floresan etiketli problar kullanılarak Flu A ve Flu B için *M1* geninin muhafaza edilen bölgesinin ve RSV için *N* geninin muhafaza edilen bölgesinin amplifikasyonundan önce ters transkriptaz ile bütünleyici DNA oluşturularak kopyalanır.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, DNA polimerazının 5´ ekzonükleaz aktivitesini temel alır. Bu enzim, DNA amplifikasyonu esnasında bütünleyici DNA sekansına giden prob bağını kırar, söndürücü boyayı raportörden ayırır. Bu reaksiyon, floresan sinyalinde hedef şablonu miktarıyla orantılı bir artış oluşturur. Bu floresans BD MAX™ Sistemi'nde ölçülebilir.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit her bir tüpte, stabilize bir formatta ve PCR inhibisyonunu izlemek için dahili bir kontrol olarak gerçek zamanlı PCR testi (spesifik primerler/problar, dNTPS, tampon, polimeraz, ters-transkriptaz) için gerekli tüm bileşenleri içerir. İnfluenza A RNA hedefleri kanal 475/520'de, İnfluenza B RNA kanal 585/630'da, RSV RNA kanal 630/665'te ve dahili kontrol (IC) kanal 530/565'te amplifiye edilir ve saptanır.

4. Sağlanan reaktifler

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, Tablo 1'de ayrıntıları verilen aşağıdaki materyalleri ve reaktifleri içerir:

Referans	Reaktif/Materyal	Açıklama	Renk	Miktar
VS-ABR212R	*Flu A, Flu B & RSV* reaksiyon tüpü	Stabilize formatta bir enzim, primer, prob, tampon, dNTP, stabilizör ve Dahili kontrol karışımı	Şeffaf Kırmızı folyo	12 tüp içeren 2 poşet
VS-RB05	Rehidrasyon Tamponu tüpü	Stabilize ürünü sulandırma çözeltisi	Şeffaf Mor folyo	24 tüp içeren 1 poşet

Tablo 1. VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit'te Ref. VS-ABR124 ile sağlanan reaktifler ve materyaller.

5. Reaktifler ve kullanıcının sağladığı ekipman

Aşağıdaki liste, VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit için gerekli olan, ancak ona dahil edilmeyen materyalleri ve ekipmanı içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR aleti: BD MAX™ Sistemi.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442828)
- BD MAX™ PCR Kartuşları (Ref: 437519)
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ve 1000 µL arasında doğru).
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler

6. Taşıma ve saklama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihinden önce 2–40 °C'de nakliye edilebilir ve saklanabilir.

- Bileşenleri güneş ışığından uzak tutun.

7. Kullanıcılar için önlemler

- Profesyonel in vitro diyagnostik kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifler ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kartonu mühürleyen etiket bozulmuşsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu, geldiğinde açık veya yırtıksa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler geldiklerinde açık veya yırtıksa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktifleri reaktif poşetleri içinde kurutucu yoksa veya açılmışsa kullanmayın.
- Reaktif poşetlerinden kurutucuyu çıkarmayın.
- Reaktiflerin koruyucu poşetini her kullanımdan sonra fermuar şeklinde kapanan mühürle hemen kapatın. Mühürlemeden önce varsa poşetlerdeki fazla havayı giderin.
- Reaktifleri folyo bozulmuş veya hasarlıysa kullanmayın.
- Farklı poşetler ve/veya kitler ve/veya lotlardan reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri neme karşı koruyun. Neme uzun süre maruziyet ürün performansına etki edebilir.
- Diğer PCR testlerinin laboratuvarda aynı alanlarda gerçekleştirilmesi durumunda, VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 ekstraksiyon kiti, test için gereken herhangi bir ek reaktif ve BD MAX™ Sistemi'nin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktifler ve kartuşlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanı'nda başlamalı ve ardından Amplifikasyon ve Saptama Alanı'na taşınmalıdır. Örnekleri, ekipmanı ve reaktifleri, önceki adımın gerçekleştirildiği alana döndürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarını takip edin. Koruyucu giysiler giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında yemeyin, içmeyin veya sigara içmeyin. Testi bitirdiğinizde ellerinizi yıkayın.
- Örneklere ve ayrıca örneklere maruz kalan reaktiflere ve materyallere potansiyel olarak enfeksiyöz muamelesi edilmelidir ve bunlar, ulusal güvenlik yönetmelikleri uyarınca kullanılmalıdır. Örneklerin toplanması, saklanması, uygulanması ve atılması esnasında gerekli önlemleri alın.
- Yaygın biçimde kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetlerin ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontaminasyonu önerilir.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına başvurun.

8. Test prosedürü

8.1. ÖRNEK TOPLAMA, SAKLAMA VE NAKLETME

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, viral nakil besiyerine hemen yerleştirilen, esnek nazofarengeal naylon floke swablarla edinilmiş boğaz swabları üzerinde doğrulanmıştır (Vircell, İspanya). Semptomatik hastaların ek respiratuvar örnekleri literatüre göre (yani, nazal ve boğaz swabı ile birleştirilen nazal/derin nazal/nazofarengeal swablar, nazofarengeal/nazal/trakeal aspiratlar, nazofarengeal/nazal/boğaz yıkama sıvıları, bronkoalveolar lavaj (BAL'ler), sputum).

Örneklerin toplanması, saklanması ve nakliyesi, kullanıcı tarafından doğrulanan koşullara göre sürdürülmelidir. Genel olarak, respiratuvar örnekler (örnek türüne bağlı olarak) nakil besiyerini içeren veya içermeyen temiz

kaplarda uygun şekilde toplanmalıdır ve etiketlenmelidir ve testin kalitesini garanti etmek için olabildiğince kısa sürede işlenmelidir. Örnekler, patojen materyalin nakli için yerel ve ulusal yönetmelikler takip edilerek nakledilmelidir. Uzun süreli (24 saatten çok) nakil için, ≤-20 °C'de nakledilmesini öneririz. Örnekler, 24 saate kadar 2 ila 8 °C'de saklanabilir veya muhafaza için -20 °C veya -70 °C'de dondurulabilir. Örneğin ve nükleik asitlerin bozunumunu önlemek üzere tekrarlanan dondurma-çözme döngülerinden kaçınılmalıdır.

8.2. ÖRNEK HAZIRLAMA VE RNA EKSTRAKSİYONU

Kullanılan ekstraksiyon kiti BD MAX™ ExK™ TNA-3'ün talimatlarında görünen öneriler uyarınca örnek hazırlama işlemini gerçekleştirin. Bazı diğer örneklerin ön işleme gerektirebildiğini unutmayın. Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürleri, kullanıcı tarafından geliştirilmelidir ve doğrulanmalıdır.

1. 200-400 µL respiratuvar klinik örneğini BD MAX™ TNA-3 Örnek Tampon Tüpüne pipetleyin bir septum kapak ile tüpü kapatın. Örneği 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek bütünüyle karışmasını sağlayın.

2. BD MAX™ Sistemi'nin Çalışması ile devam edin.

8.3. PCR PROTOKOLÜ

Not: Ayrıntılı talimat için lütfen BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına başvurun.

8.3.1. VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit için PCR test programı oluşturma

Not: Zaten VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection test oluşturduysanız, adım 8.3.1'i atlayabilir ve doğrudan 8.3.2'ye geçebilirsiniz.

1) BD MAX™ Sistemi'nin "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
2) "Create" (Oluştur) düğmesini tıklatın.
3) "Test Name" (Test Adı) penceresinde, testinizi adlandırın: yani, VIASURE *Flu A, Flu B & RSV*.
4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-3" öğesini seçin.
5) "Master Mix Format" (Ana Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5" (Tip 5) öğesini seçin.
   a. Not: Ürün, BD MAX testi için ek bir Viasure ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponu içeren İkili Ana Karışım Konsantre Liyofilize MM (Tip 5) öğesini seçin.
6) "Sample extraction parameters" (Örnek ekstraksiyon parametreleri) öğesinde, "User defined" (Kullanıcı tanımlı) öğesini seçin örnek hacmini kullanılan klinik örnek artı 550 µL hacmine ayarlayın.
   a. Örnek: 200 µL respiratuvar klinik örneği BD MAX TNA-3 Örnek Tampon Tüpüne pipetleniyorsa, parametreyi 750 µL'ye ayarlayın.
   b. Not: maksimum ayar 950 µL'dir.
7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplama) penceresinde, "Call Ct at Threshold Crossing" (Ct'yi Eşik Geçişinde Çağır) öğesini seçin.

8) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazançlar) ve "Threshold (Eşik) (Tablo 2).

   a. Not: Ürün, BD MAX testi için ek bir Viasure ile birlikte kullanılabilir, PCR Ayarları ve Test Adımları ek bileşen 2 (yeşil) ve ek bileşen 4 (mavi) konumları için tamamlanmalıdır.

Channel (Kanal)	Alias (Takma Ad)	Gain (Kazanç)	Threshold (Eşik)	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

Tablo 2. PCR settings (PCR ayarları).

9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde, aşağıdaki "Spectral Cross Talk" (Spektral Çapraz Konuşma) (Tablo 3) parametrelerini de girin

		False Receiving Channel (Yanlış Alan Kanal)				
	Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Uyarım Kanalı)	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	-

Tablo 3. Spectral cross-talk parameters (Spektral çapraz konuşma parametreleri).

10) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesinde, PCR protokolünü girin (Tablo 4).

Step Name (Adım Adı)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süre(ler))	Temperature (Sıcaklık)	Detect (Saptama)
Ters transkripsiyon	Hold (Tutma)	1	900	45 °C	-
Başlangıç denatürasyonu	Hold (Tutma)	1	120	98 °C	-
Denatürasyon ve Primer Bağlanması/ Uzantı (Veri toplama)	2 - Temperature (Sıcaklık)	45	10	95 °C	-
			61.1	63 °C	✓

Tablo 4. PCR protokolü.

11) "Save Test" (Testi Kaydet) düğmesini tıklatın.

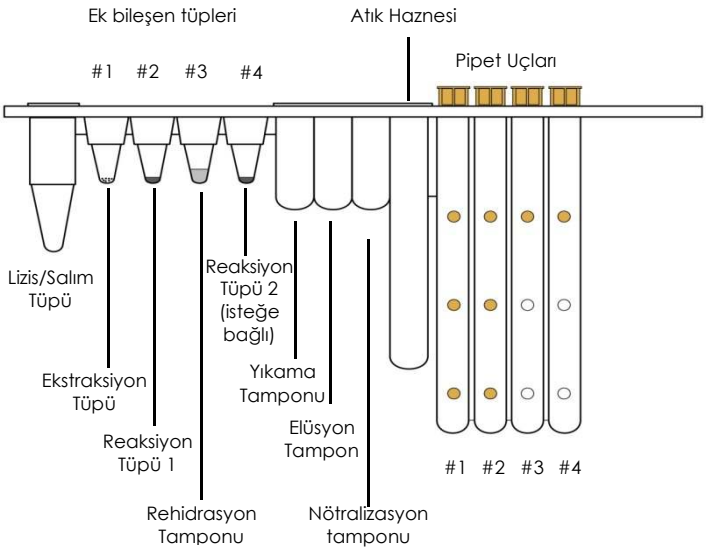
8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu

1) Test edilecek her bir örnek için, bir Ünitelendirilmiş Reaktif Stribini (BD MAX™ TNA Reaktifi Stribi (TNA)) BD MAX™ ExK TNA-3 kitinden çıkarın. Her stribi, tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olmasını sağlayacak şekilde sert bir yüzeye hafifçe vurun ve BD MAX™ Sistemi örnek raflarına yükleyin.
2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK™ TNA Ekstraksiyon Tüpünü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü (Tüplerini) TNA'da karşılık gelen konumlarına oturtun (Raftaki beyaz renk kodlu

konum 1'e oturtun. Bkz. Şekil 1). Fazla havayı çıkarın ve poşeti fermuar şeklinde kapanan mühür ile kapatın.

3) Uygun sayıda VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* reaksiyon tüpünü (kırmızı folyo) belirleyin ve ayırın ve stripte karşılık gelen konumlarına oturtun (Raftaki yeşil renk kodlu konum 2'ye oturtun. Bkz. Şekil 1).
   a. Fazla havayı çıkarın ve alüminyum poşetleri fermuar şeklinde kapanan mühür ile kapatın.
   b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün borunun dibinde olduğundan ve borunun üst kısmına veya folyo contasına yapışmadığından emin olun.
      i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponu içeren İkili Ana Karışım Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) formatını seçerseniz (Bölüm 8.3.1), uygun sayıda ek VIASURE reaksiyon tüpünü (farklı folyo) belirleyin ve ayırın ve stripte karşılık gelen konumlarına oturtun (Raftaki mavi renk kodlu konum 4'e oturtun. Bkz. Şekil 1). Fazla havayı çıkarın ve alüminyum poşetleri fermuar şeklinde kapanan mühür ile kapatın.

4) Gerekli sayıda Rehidrasyon Tamponu tüpünü (mor folyo) çıkarın ve stripte karşılık gelen konumlarına oturtun (Raftaki renksiz kodlu konum 3'e oturtun. Bkz. Şekil 1). Fazla havayı çıkarın ve poşeti fermuar şeklinde kapanan mühür ile kapatın.
   a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının borunun dibinde olduğundan ve borunun üst kısmına veya folyo contasına yapışmadığından emin olun.



Şekil 1. BD MAX™ ExK TNA-3 kitinden BD MAX™ TNA Reaktifi Stribi (TNA).

8.3.3. BD MAX™ Aleti kurulumu

1) BD MAX™ Sistemi yazılım v4.50A veya üzerindeki" Run" (Çalıştır) sekmesinde "Work List"i (İş Listesi) seçin.
2) "Test" aşağı açılır menüsünde, VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* öğesini seçin (zaten oluşturulmadıysa, bkz. Bölüm 8.3.1).
3) Aşağı açılan menüden ilgili kit lot numarasını seçin (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) (isteğe bağlı).
4) Örnek Tampon Tüpü kimlik numarasını, İş Listesi'nin Örnek tüpüne, barkodu tarayıcıyla tarayarak veya manuel olarak girin.

5) Örnek/Hasta Kimliğini İş Listesi'nin Accession (Erişim) penceresine (varsa) doldurun ve "Save" (Kaydet) düğmesini tıklatın. Tüm Örnek Tamponu tüpleri girilene dek devam edin. Örnek/hasta kimliği ve Örnek Tamponu tüplerinin doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
6) Hazırlanan Örnek Tamponu Tüpünü BD MAX™ Rafına (Raflarına) yerleştirin.
7) Rafı (rafları) BD MAX™ Sistemine yükleyin (Raf A, BD MAX™ Sisteminin sol tarafına ve Raf B sağ tarafına yerleştirilir).
8) BD MAX™ Sistemi'ne gereken sayıda BD MAX™ PCR Kartuşu (Kartuşları) yerleştirin.
9) BD MAX™ Sisteminin kapağını kapatın.
10) Prosedürü başlatmak için "Start Run" (Çalışmayı Başlat) düğmesini tıklatın.

8.3.4. BD MAX™ Raporu

1) Ana menüde, "Results" (Sonuçlar) düğmesini tıklatın.
2) Listede çalışmanızı çift tıklatın veya "view" (görünüm) düğmesine basın.
3) "Print" (Yazdır) düğmesini tıklatın, şunu seçin: "Run Details, Test Details and Plot…" (Çalışma Ayrıntıları, Test Ayrıntıları ve Grafik...)
4) "Run Reports" (Çalışma Raporları) ekranında "Print or Export" (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesini tıklatın.

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin analiz yöntemine ilişkin ayrıntılı açıklamalar için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı el kitabına bakın.

Veri analizi, üreticinin talimatları uyarınca BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı aşağıdaki yöntemle test edilen her örneğin her bir dedektör kanalı için Ct değerleri ve amplifikasyon eğrilerini rapor eder:

- Ct 0 değeri, belirlenen Eşik Değeri (bkz. Tablo 4) ile hesaplanan Ct değeri bulunmadığını ifade eder. "0" Ct değeri gösteren örneğin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- Ct -1 değeri amplifikasyon işlemi gerçekleşmediğini belirtir.

- Diğer Ct değeri amplifikasyon eğrisiyle korelasyon içinde ve Tablo 5'te belirtilen örnek yorumlama talimatlarına göre yorumlanmalıdır.

Amplifikasyon karışımının doğru işlev gösterdiğini doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalini kontrol edin. Ek olarak, BD MAX™ Sistem hatası raporu bulunmadığından emin olun.

Aşağıdaki tabloyu kullanarak sonuçları okuyun ve analiz edin:

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Dahili kontrol (530/565)	Yorumlama
-	-	-	+	**Flu A, Flu B ve RSV Negatif**
+	+	+	+/-	**Flu A, Flu B ve RSV Pozitif**
+	-	-	+/-	**Flu A Pozitif, Flu B ve RSV Negatif**
+	+	-	+/-	**Flu A ve Flu B Pozitif ve RSV Negatif**
+	-	+	+/-	**Flu A ve RSV Pozitif ve Flu B Negatif**
-	+	-	+/-	**Flu B Pozitif, Flu A ve RSV Negatif**
-	+	+	+/-	**Flu B ve RSV Pozitif, Flu A Negatif**
-	-	+	+/-	**RSV Pozitif, Flu A ve Flu B Negatif**
UNR	UNR	UNR	UNR	**Çözülmemiş (UNR) PCR reaksiyonunda inhibitörlerin olması veya numune işleme ve/veya amplifikasyon adımlarında genel bir sorun (bir hata kodu ile rapor edilmemiş) meydana geldiğinde elde edilen sonuç.**
IND	IND	IND	IND	**Belirsiz tahlil sonucu (IND). BD MAXTM Sistem arızası nedeniyle. Bir hata koduna bağlı bir cihaz arızası durumunda gösterilen tahlil sonucu.**
INC	INC	INC	INC	**Eksik tahlil sonucu (INC). BD MAXTM Sistem arızası nedeniyle. Çalışmanın tamamlanamaması durumunda gösterilen tahlil sonucu.**

Tablo 5. Örneklerin yorumlanması

+: Amplifikasyon eğrisi

-: Amplifikasyon eğrisi yok

Edinilen Ct değeri 40'tan azsa örnek pozitif kabul edilir. Dahili kontrol amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir, çünkü yüksek hedef kopya sayısı, dahili kontrol yerine hedefe özel nükleik asitlerin tercih edilen amplifikasyonuna neden olur. Bu vakalarda, IC'nin saptanması gerekli değildir.

Örnek, saptama sisteminde amplifikasyon sinyali göstermezse, örnek negatif kabul edilir, ancak dahili kontrol pozitiftir. PCR reaksiyonunun inhibisyonu, dahili kontrolün amplifikasyonuyla dışarıda bırakılır.

Çözümlenmemiş sonuçların olması, negatif örnekte dahili kontrol sinyalinin olmaması durumunda, inhibisyon için olası sorunları kontrol etmek üzere örneği 1:10 seyrelterek testin tekrarlanmasını öneririz.

10. Testin sınırlamaları

- Testin sonuçları, tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer diyagnostik testler bağlamında bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Bu test, diğer örnek tipleriyle kullanılabilmesine rağmen, boğaz swabları ile doğrulanmıştır.
- Testin kalitesi, örneğin kalitesine bağlıdır; klinik örneklerden düzgün RNA ekstrakte edilmelidir. Örneklerin uygunsuz toplanması, saklanması ve/veya nakledilmesi yanlış negatif sonuçlar verebilir.
- Testin saptama sınırı altında çok düşük hedef düzeyleri saptanabilir ama sonuçlar tekrar edilemeyebilir.

- Flu A, Flu B ve/veya RSV, yüksek hedef RNA konsantrasyonları içeren örneklerle çapraz kontaminasyonla veya önceki reaksiyonlardan gelen PCR ürünleri yüzünden kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçların olması ihtimali vardır.
- VIASURE *Flu A, Flu B ve RSV* Gerçek Zamanlı PCR Tespit Kiti ile elde edilen sonuçlar, numunenin liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün inhibitörleri veya yanlış rehidrasyonunu içermesi dolayısıyla çözülmemiş olabileceği gibi, cihaz arızası nedeniyle Belirsiz veya Eksik olabilir ve tekrar test edilmesini gerektirir

11. Kalite kontrolü

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit her bir reaksiyon tüpünde, tekniğin doğru uygulandığını onaylayan dahili bir kontrolü (IC) içerir.

12. Performans özellikleri

12.1. Klinik duyarlılık ve özgünlük

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit'in klinik performansı semptomatik hastalardan gelen 344 respiratuvar örnek (boğaz swabı) kullanılarak test edilmiştir. Bu sonuçlar moleküler saptama yöntemiyle edinilenlerle karşılaştırılmıştır (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Sonuçlar şöyledir:

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

Tablo 6. Flu A için karşılaştırmalı sonuçlar.

Pozitif benzerlik yüzdesi >%98 ve Negatif benzerlik yüzdesi >%96.

**Bu respiratuvar örnekteki düşük şablon RNA miktarı, kullanılan yöntemin saptama sınırının altındadır.*

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

Tablo 7. Flu B için karşılaştırmalı sonuçlar.

Pozitif benzerlik yüzdesi >%96 ve Negatif benzerlik yüzdesi >%99.

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

Tablo 8. RSV için karşılaştırmalı sonuçlar.

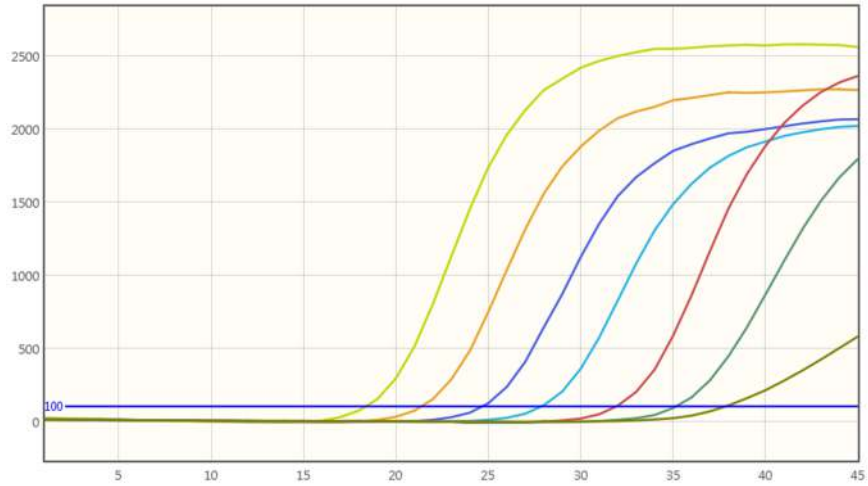
Pozitif benzerlik yüzdesi >%84 ve Negatif benzerlik yüzdesi >%99.

Sonuçlar, VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit kullanılarak İnfluenza A, İnfluenza B ve/veya RSV virüslerini saptamada yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedir.

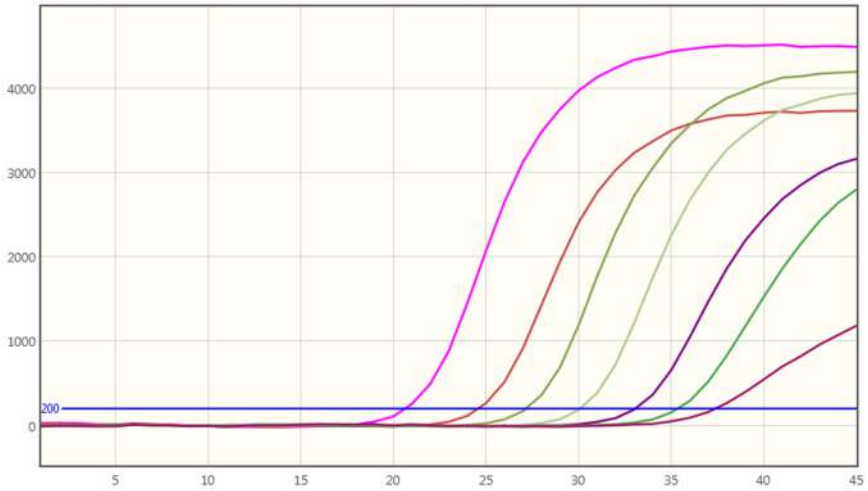
12.2. Analitik duyarlılık

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit, ≥%95 pozitif oranla, Flu A, Flu B ve RSV için reaksiyon başına ≥10 RNA saptama sınırına sahiptir (Şekil 2, 3 ve 4).

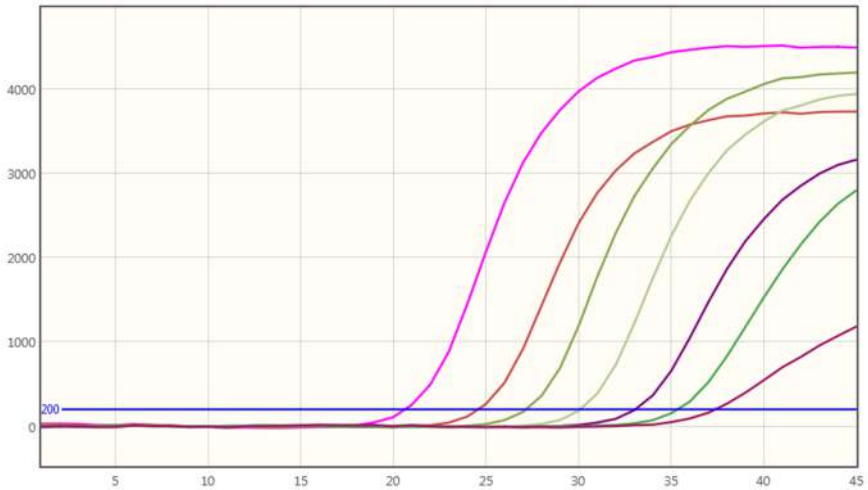
Şekil 2. BD MAX™ Sisteminde yürütülen Flu A ($2*10^6$-$2*10^1$ kopya/rxn) şablonu seyreltim serisi (475/520 (FAM) kanalı).



Şekil 3. BD MAX™ Sisteminde yürütülen Flu B ($2*10^6$-$2*10^1$ kopya/rxn) şablonu seyreltim serisi (475/520 (FAM) kanalı).



Şekil 4. BD MAX™ Sisteminde yürütülen RSV ($2*10^6$-$2*10^0$ kopya/rxn) şablonu seyreltim serisi (630/665 (Cy5) kanalı).



12.3. Analitik özgüllük

Flu A, Flu B ve RSV testinin özgüllüğü, en yaygın respiratuvar patojenleri temsil eden farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panel test edilerek onaylanmıştır. Her tahlilin hedeflenen patojenleri dışında, test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbiri arasında çapraz reaktivite tespit edilmedi:

Çapraz reaktivite testi					
Bordetella pertussis	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
Bordetella parapertussis	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
Legionella pneumophila	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
Mycoplasma pneumoniae	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
Streptococcus pneumoniae	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
Haemophilus influenzae MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
Moraxella catarrhalis	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
Chlamydophila pneumoniae	-	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	-/+		

Tablo 9. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.

12.4. Analitik reaktivite

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kitin Flu A için reaktivitesi, şu suşlara göre değerlendirilmiştir: AA/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2) - like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) ve A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus pozitif sonuçlar göstermiştir.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kitin Flu B için reaktivitesi, şu suşlara göre değerlendirilmiştir: 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 ve B/Maryland/15/2016, pozitif sonuçlar göstermiştir.

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kitin RSV için reaktivitesi, İnsan Respiratuvar Sinsitiyal Virüs'e (RSV A ve B) göre değerlendirilmiştir, pozitif sonuçlar göstermiştir.

13. Bibliography/Kaynakça

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/IVD bileşenleri ve reaktifleri için semboller

IVD	*In vitro* diagnostic device *In vitro* diyagnostik cihaz		Keep dry Kuru tutun		Use by Son kullanma tarihi		Manufacturer Üretici	LOT	Batch code Parti kodu
	Consult instructions for use Kullanım talimatına bakınız		Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması	Σ	Contains sufficient for <n> test <n> test için yeterli malzeme içerir	DIL	Sample diluent Örnek seyreltim sıvısı	REF	Catalogue number Katalog numarası

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 CSQ MED ISO 13485

Real Time PCR Detection Kits

CerTest BIOTEC