

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

Handbook for the following references/

Εγχειρίδιο για τις ακόλουθες αναφορές:

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

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

προς χρήση με το BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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



3. Principle of the procedure

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

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

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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



6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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



aspirates, nasopharyngeal/nasal/throat washes, bronchoalveolar lavage (BALs), sputum), but must be validated by the user.

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

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 μL .
 - a. Example: If pipette 200 μL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 μL .
 - b. Note: maximum setting is 950 μL .
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".



- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
- a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 2. PCR settings.

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

		False Receiving Channel				
	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

- 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.
- 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.
- 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
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - 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.

Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number



of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (purple foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to carry out a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

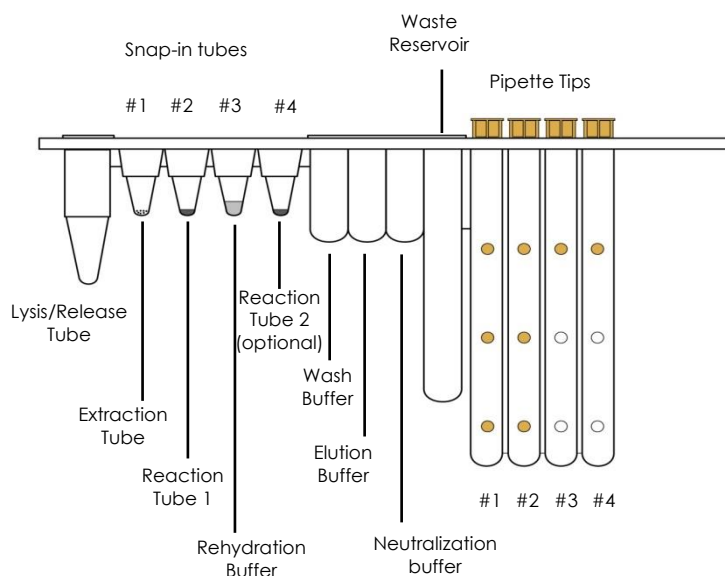


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID into Accession window of the Worklist (if applicable) and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4 BD MAX™ Report

- 1) In main menu, click the "Results" button.

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

Using the following table read and analyze the results:

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

Table 5. Sample interpretation
 +: Amplification occurred
 -: No amplification occurred



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

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

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

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.

10. Limitations of the test

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

The results were as follows:



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

Table 6. Comparative results for Flu A.

Positive percent agreement is >98% and negative percent agreement is >96%.

*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

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

Table 7. Comparative results for Flu B.

Positive percent agreement is >96% and negative percent agreement is >99%.

*The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.

VIASURE 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.

12.2. 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).

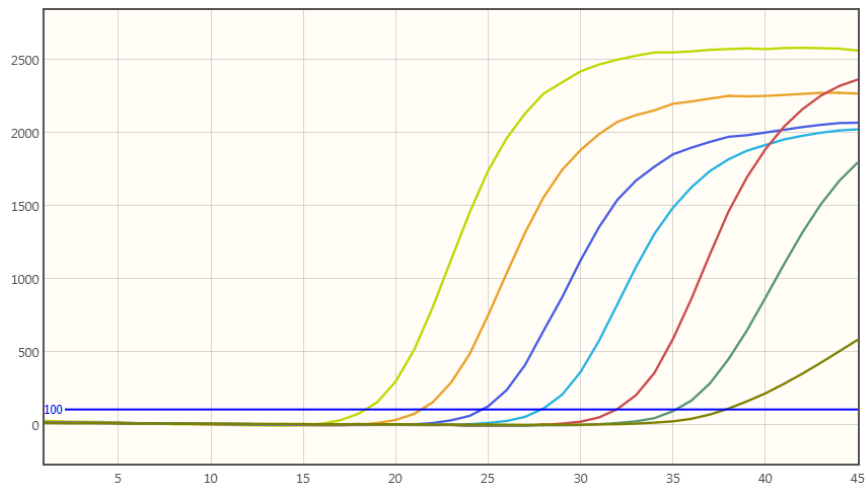


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

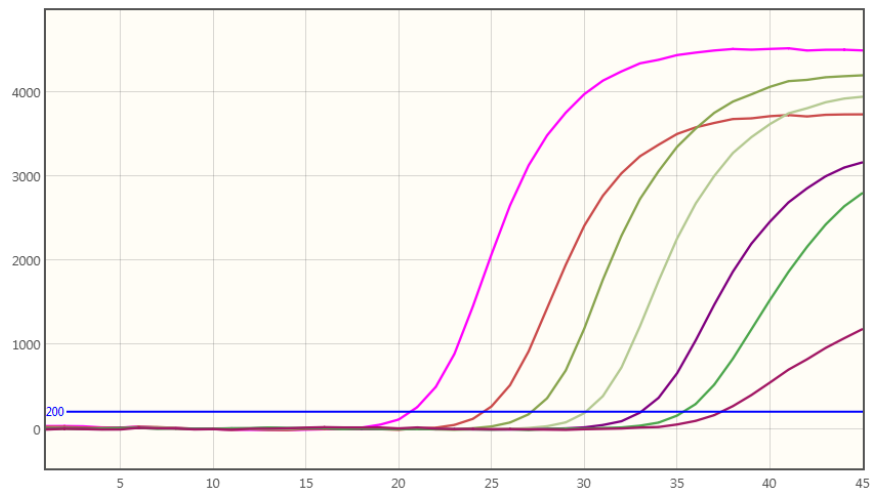
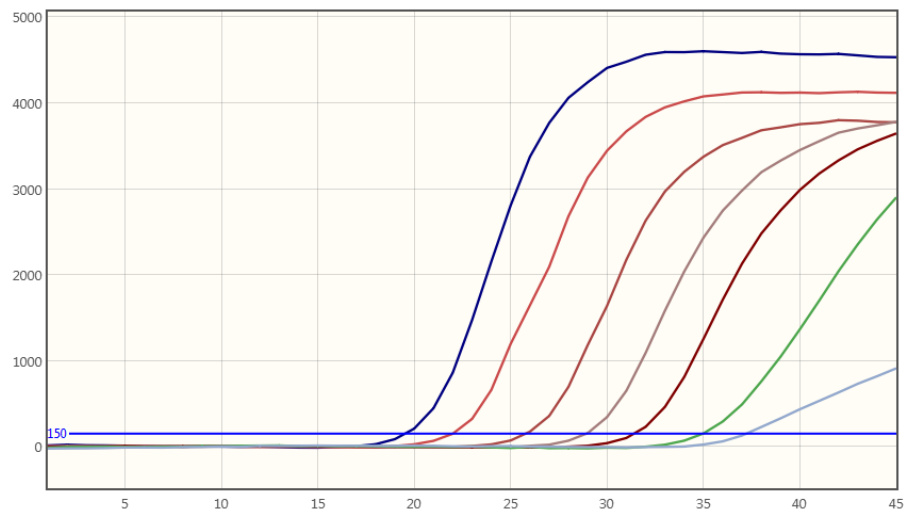


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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/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.



12.4. 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.



ΕΛΛΗΝΙΚΑ

1. Προβλεπόμενη χρήση

Το kit ανίχνευσης VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit έχει σχεδιαστεί για την αναγνώριση και τη διαφοροποίηση του ιού της Γρίπης Α, της Γρίπης Β (Flu A ή/και Β) ή/και του ανθρώπινου Αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV) σε αναπνευστικά δείγματα από ασθενείς με σημεία και συμπτώματα λοίμωξης του αναπνευστικού. Αυτό το τεστ προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση των ιών της Γρίπης Α, της Γρίπης Β ή/και του RSV σε συνδυασμό με τους παράγοντες κλινικού και επιδημιολογικού κινδύνου. Η ανάλυση χρησιμοποιεί το σύστημα BD MAX™ για την εξαγωγή του RNA και της επακόλουθης RT-PCR σε πραγματικό χρόνο, αξιοποιώντας τα αντιδραστήρια που παρέχονται σε συνδυασμό με καθολικά αντιδραστήρια και αναλώσιμα για το σύστημα BD MAX™. Το RNA από τα κλινικά δείγματα ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας φθορίζοντες ανιχνευτές χρωστικής αναφοράς, ειδικούς για τους ιούς της Γρίπης Α, της Γρίπης Β και του RSV.

2. Σύνοψη και επεξήγηση

Οι ιοί της γρίπης ανήκουν στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* και ευθύνονται για την πλειοψηφία των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού. Οι ιοί της Γρίπης Α και Β αποτελούν σημαντικές αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, αν λάβουμε υπόψη ότι οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με προβλήματα υγείας διατρέχουν ιδιαίτερο κίνδυνο ανάπτυξης σοβαρής ασθένειας και επιπλοκών, όπως η πνευμονία. Οι ασθενείς εμφανίζουν ορισμένα ή και όλα τα ακόλουθα συμπτώματα: πυρετός ή αίσθηση πυρετού/ρίγη, βήχας, πονόλαιμος, ρινική συμφόρηση και καταρροή, μυαλγία, πονοκέφαλος και ανορεξία. Οι ιοί της γρίπης μπορούν να μεταδοθούν από άτομο σε άτομο με δύο διαφορετικούς τρόπους: μέσω του αέρα (μεγάλα σταγονίδια και αερολύματα από φτέρνισμα και βήχα) και μέσω της άμεσης ή έμμεσης επαφής.

Οι ιοί της Γρίπης Α και Β είναι μονόκλωνοι ιοί RNA με περίβλημα, οι οποίοι περιέχουν οκτώ διακριτούς κλώνους γονιδιωματικού RNA που κατά κανόνα κωδικοποιούν 11 ή 12 ιικές πρωτεΐνες. Το ιικό περίβλημα, το οποίο προέρχεται από την πλασματική μεμβράνη του ξενιστή, αποτελείται από μια διπλή στοιβάδα λιπιδίων που περιέχει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως η αιμαγλουτίνη (HA) και η νευραμινιδάση (NA), καθώς και τις πρωτεΐνες μήτρας M1 και M2. Ο ιός της Γρίπης Α ταξινομείται περαιτέρω σε υποτύπους με βάση την αντιγονικότητα των μορίων "HA" και "NA" τους, ενώ ο ιός της Γρίπης Β χωρίζεται σε 2 αντιγονικά και γενετικά διακριτές εξελικτικές γραμμές, τις Victoria και Yamagata.

Οι ανθρώπινο Αναπνευστικοί συγκυτιακοί ιοί (RSV) ανήκουν στην οικογένεια *Paramyxoviridae* και είναι οι πιο σημαντικοί ιογενείς παράγοντες των οξέων αναπνευστικών λοιμώξεων. Ο RSV είναι ένας ιός με περίβλημα, μη κατακερματισμένου, αρνητικού, μονόκλωνου, γραμμικού RNA γονιδιώματος, με περίβλημα. Ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός είναι ένας συνήθης παράγοντας πρόκλησης αναπνευστικών λοιμώξεων, ο οποίος προκαλεί βρογχίτιδα, πνευμονία και χρόνιες αναπνευστικές λοιμώξεις σε άτομα κάθε ηλικίας. Οι ασθενείς συχνά εμφανίζουν ορισμένα ή και όλα τα ακόλουθα συμπτώματα: ρινορροια, χαμηλός πυρετός, βήχας, πονόλαιμος, πονοκέφαλος και συριγμός. Ο RSV μεταδίδεται μέσω της έκκρισης μεγάλων ρινοφαρυγγικών σταγονιδίων από μολυσμένα άτομα, με στενή επαφή ή από αυτοενοφθαλμισμό μετά από άγγιγμα μολυσμένων επιφανειών.

Η διάγνωση μπορεί να αποδειχθεί προβληματική, καθώς οι οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις προκαλούνται από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών και εκδηλώνονται με παρόμοια κλινικά σύνδρομα. Οι αναλύσεις PCR σε



πραγματικό χρόνο έχουν δείξει ότι αποτελούν ένα ευαίσθητο και εξειδικευμένο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των ιών της Γρίπης A, της Γρίπης B και του RSV.

3. Αρχή της διαδικασίας

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit έχει σχεδιαστεί για τη διάγνωση των ιών της Γρίπης A, της Γρίπης B ή/και του RSV σε αναπνευστικά δείγματα. Η ανίχνευση γίνεται με μέθοδο RT ενός βήματος σε πραγματικό χρόνο, όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η επακόλουθη ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου συμβαίνουν στο ίδιο σωληνάριο αντίδρασης. Ο απομονωμένος στόχος RNA μεταγράφεται δημιουργώντας συμπληρωματικό DNA με αντίστροφη μεταγραφάση που ακολουθείται από την ενίσχυση μιας διατηρημένης περιοχής του γονιδίου M1 για τον ιό της Γρίπης A και της Γρίπης B και μιας διατηρημένης περιοχής του γονιδίου N για τον ιό RSV, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές και ανιχνευτές φθορίζουσας σήμανσης.

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit βασίζεται στη δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 5' της πολυμεράσης DNA. Κατά την ενίσχυση του DNA, αυτό το ένζυμο διασπά τον ανιχνευτή που συνδέεται με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA, διαχωρίζοντας τη χρωστική απόσβεσης από τον ανιχνευτή αναφοράς. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί αύξηση στο σήμα φθορισμού που είναι ανάλογη με την ποσότητα του προτύπου-στόχου. Ο φθορισμός μπορεί να μετρηθεί με το σύστημα BD MAX™.

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit περιέχει σε κάθε σωλήνα όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο (ειδικοί εκκινητές/ανιχνευτές, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα, πολυμεράση, αντίστροφη μεταγραφάση) σε σταθεροποιημένη μορφή, καθώς και έναν εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της αναστολής PCR. Οι στόχοι RNA του ιού της Γρίπης A ενισχύονται και ανιχνεύονται στο κανάλι 475/520, το RNA του ιού της Γρίπης B στο κανάλι 585/630, το RNA του ιού RSV στο κανάλι 630/665 και ο εσωτερικός μάρτυρας (IC) στο κανάλι 530/565.

4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά και αντιδραστήρια που παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 1:

Αναφορά	Αντιδραστήριο/Υλικό	Περιγραφή	Χρώμα	Ποσότητα
VS-ABR212R	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> reaction tube	Ένα μείγμα ενζύμων, ανιχνευτών-εκκινητών, ρυθμιστικού διαλύματος, dNTPs, σταθεροποιητών και εσωτερικού μάρτυρα σε σταθεροποιημένη μορφή	Διάφανο Κόκκινο αλουμινόχαρτο	2 σακούλες των 12 σωληναρίων
VS-RB05	Rehydration Buffer tube	Διάλυμα για την ανασύσταση του σταθεροποιημένου προϊόντος	Διάφανο Μωβ αλουμινόχαρτο	1 σακούλα των 24 σωληναρίων

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια και υλικά που παρέχονται στο kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit με αναφ. VS-ABR124.

5. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που παρέχονται από τον χρήστη

Στην ακόλουθη λίστα περιλαμβάνονται τα υλικά και ο εξοπλισμός που απαιτούνται για τη χρήση, αλλά δεν περιλαμβάνονται στο kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit.



- Όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Αναφ.: 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Αναφ.: 437519)
- Στρόβιλος.
- Μικροπιπέτες (ακρίβεια μεταξύ 2 και 1000 µL).
- Άκρα φίλτρου.
- Γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα

6. Συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης

- Τα κιτ μπορούν να αποσταλούν και να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες 2-40°C έως την ημερομηνία λήξης η οποία δηλώνεται στην ετικέτα.
- Διατηρήστε τα στοιχεία μακριά από το φως του ήλιου.

7. Προφυλάξεις για τους χρήστες

- Για in vitro διαγνωστική χρήση από επαγγελματίες.
- Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα αντιδραστήρια ή/και υλικά.
- Μην χρησιμοποιείτε το κιτ εάν έχει ανοιχτεί η ετικέτα που σφραγίζει το εξωτερικό κουτί.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν το προστατευτικό κουτί είναι ανοιχτό ή σπασμένο κατά την άφιξη.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν οι προστατευτικές θήκες είναι ανοιχτές ή σπασμένες κατά την άφιξη.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν δεν υπάρχει το αποξηραντικό ή αν είναι σπασμένο μέσα στις θήκες των αντιδραστηρίων.
- Μην αφαιρείτε το αποξηραντικό από τις θήκες αντιδραστηρίων.
- Κλείστε αμέσως τα προστατευτικά σακουλάκια των αντιδραστηρίων με το φερμουάρ σφράγισης μετά από κάθε χρήση. Αφαιρέστε τυχόν πλεονάζοντα αέρα από τα σακουλάκια πριν από τη σφράγιση.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν το αλουμινόχαρτο έχει ανοιχτεί ή έχει υποστεί ζημιά.
- Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά σακουλάκια ή/και κιτ ή/και παρτίδες.
- Προστατεύστε τα αντιδραστήρια από την υγρασία. Η παρατεταμένη έκθεση σε υγρασία μπορεί να επηρεάσει την απόδοση του προϊόντος.
- Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες διεξάγονται άλλα τεστ PCR στην ίδια γενική περιοχή του εργαστηρίου, πρέπει να είστε ιδιαίτερα προσεκτικοί ώστε να εξασφαλίσετε ότι το κιτ ανίχνευσης VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, το κιτ εξαγωγής BD MAX™ ExK™ TNA-3, τυχόν πρόσθετα αντιδραστήρια που απαιτούνται για τον έλεγχο και το σύστημα BD MAX™ δεν έχουν μολυνθεί. Θα πρέπει να αλλάζετε γάντια πριν από το χειρισμό των αντιδραστηρίων και των δοχείων.
- Σχεδιάστε μια μονόδρομη ροή εργασιών. Θα πρέπει να ξεκινά από την περιοχή εξαγωγής και να συνεχίζει στην περιοχή ενίσχυσης και ανίχνευσης. Μην επιστρέφετε δείγματα, εξοπλισμό και αντιδραστήρια στην περιοχή στην οποία πραγματοποιήθηκε το προηγούμενο βήμα.
- Ακολουθήστε τις καλές πρακτικές εργαστηρίου. Φορέστε προστατευτικά ρούχα, χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, γυαλιά και μάσκα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε στην περιοχή εργασίας. Μόλις ολοκληρώσετε το τεστ, πλύντε τα χέρια σας.



- Τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά, όπως επίσης και όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που έχουν εκτεθεί στα δείγματα και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς ασφαλείας. Λάβετε τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά τη συλλογή, την αποθήκευση, το χειρισμό και την απόρριψη των δειγμάτων.
- Συνιστάται η τακτική απολύμανση του συνήθως χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού, ειδικά στις μικροπιπέτες και τις επιφάνειες εργασίας.
- Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™ για πρόσθετες προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες.

8. Διαδικασία του τεστ

8.1. ΣΥΛΛΟΓΗ, ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit έχει επικυρωθεί σε φαρυγγικά επιχρίσματα, τα οποία ελήφθησαν με εύκαμπτους ρινοφαρυγγικούς στείλους με βύσμα από νάilon που τοποθετούνται αμέσως σε μέσο μεταφοράς ιογενούς υλικού (Vircell, Ισπανία). Πρόσθετα αναπνευστικά δείγματα από συμπτωματικούς ασθενείς μπορούν να εξεταστούν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (δηλ. ρινικά/βαθιά ρινικά/ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, συνδυασμένα ρινικά και φαρυγγικά επιχρίσματα, ρινοφαρυγγικές/ρινικές/τραχειακές αναρροφήσεις, ρινοφαρυγγικά/ρινικά/φαρυγγικά εκπλύματα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), πτύελο), αλλά πρέπει να επικυρώνονται από τον χρήστη.

Τα δείγματα συλλογής, αποθήκευσης και μεταφοράς πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με τις συνθήκες που επικυρώνονται από τον χρήστη. Συνολικά, τα αναπνευστικά δείγματα πρέπει να συλλέγονται και να επισημαίνονται κατάλληλα σε καθαρά δοχεία με ή χωρίς μέσα μεταφοράς (ανάλογα με τον τύπο του δείγματος) και να υποβάλλονται σε επεξεργασία το συντομότερο δυνατό ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα του τεστ. Τα δείγματα πρέπει να μεταφέρονται σύμφωνα με τους τοπικούς και εθνικούς κανονισμούς για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Για μακροπρόθεσμη μεταφορά (περισσότερες από 24 ώρες), προτείνουμε την αποστολή σε θερμοκρασία $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες από 2°C έως 8°C για έως και 24 ώρες ή κατεψυγμένα στους -20°C ή στους -70°C για διατήρηση. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης πρέπει να αποφεύγονται προκειμένου να αποφευχθεί η υποβάθμιση του δείγματος και των νουκλεϊκών οξέων.

8.2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ RNA

Εκτελέστε την προετοιμασία του δείγματος σύμφωνα με τις συστάσεις στις οδηγίες χρήσης του kit εξαγωγής που χρησιμοποιείται, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Να σημειωθεί ότι ορισμένα άλλα δείγματα μπορεί να απαιτούν προεπεξεργασία. Πρέπει να αναπυχθούν και να επικυρωθούν από τον χρήστη οι διαδικασίες προετοιμασίας εξαγωγής για συγκεκριμένες εφαρμογές.

1. Χορηγήστε με πιπέττα 200-400 μL αναπνευστικού κλινικού δείγματος σε σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος BD MAX™ TNA-3 και κλείστε τον σωλήνα με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό.
2. Συνεχίστε στη λειτουργία του συστήματος BD MAX™.



8.3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PCR

Σημείωση: Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™ για αναλυτικές οδηγίες.

8.3.1. Δημιουργία προγράμματος τεστ PCR για το κιτ ανίχνευσης VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit

Σημείωση: Αν έχετε ήδη δημιουργήσει το τεστ VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection test, μπορείτε να παραλείψετε το βήμα 8.3.1 και να μεταβείτε απευθείας στο βήμα 8.3.2.

- 1) Στην οθόνη "Run" (Εκτέλεση) του συστήματος BD MAX™, επιλέξτε την καρτέλα "Test Editor" (Επεξεργασία τεστ).
- 2) Κάντε κλικ στο κουμπί "Create" (Δημιουργία).
- 3) Στο παράθυρο "Test Name" (Όνομα τεστ), δώστε όνομα στο τεστ σας: π.χ. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Extraction Type" (Τύπος εξαγωγής), επιλέξτε "ExK TNA-3".
- 5) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Master Mix Format" (Μορφή κύριας ανάμειξης), επιλέξτε "Type 5" (Τύπος 5).
 - β. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ Viasure για BD MAX, και στη συνέχεια να επιλέξετε "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)).
- 6) Στην περιοχή "Sample extraction parameters" (Παράμετροι εξαγωγής δείγματος), επιλέξτε "User defined" (Καθορισμός από τον χρήστη) και προσαρμόστε τον όγκο στον όγκο του κλινικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε συν 550 µL.
 - α. Παράδειγμα: Αν πρόκειται για χορήγηση με πιπέττα 200 µL κλινικού αναπνευστικού δείγματος σε σωληνάριο BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, ρυθμίστε την παράμετρο σε 750 µL.
 - β. Σημείωση: η μέγιστη ρύθμιση είναι 950 µL.
- 7) Στην περιοχή "Ct Calculation" (Υπολογισμός Ct), επιλέξτε "Call Ct at Threshold Crossing" (Κλήση Ct κατά την υπέρβαση κατωφλίου).
- 8) Στην καρτέλα "PCR settings" (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε τις ακόλουθες παραμέτρους: "Channel Settings" (Ρυθμίσεις καναλιού), "Gains" (Αυξήσεις) και "Threshold" (Κατώφλιο) (Πίνακας 2).
 - α. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ Viasure για BD MAX. Οι ρυθμίσεις PCR και τα βήματα του τεστ θα πρέπει να ολοκληρωθούν για τις θέσεις προσάρτησης 2 (πράσινο) και 4 (μπλε).

Channel (Κανάλι)	Alias (Ψευδώνυμο)	Gain (Αύξηση)	Threshold (Κατώφλιο)	Ct Min (Ελάχιστο Ct)	Ct Max (Μέγιστο Ct)
475/520 (FAM)	Γρίπη Α	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	300	0	40
585/630 (ROX)	Γρίπη Β	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Πίνακας 2. Ρυθμίσεις PCR.

- 9) Στην καρτέλα "PCR settings" (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε επίσης τις ακόλουθες παραμέτρους "Spectral Cross Talk" (Φασματική συνακρόαση) (Πίνακας 3)



		False Receiving Channel (Εσφαλμένο κανάλι υποδοχής)					
		Channel (Κανάλι)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Κανάλι διέγερσης)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	2,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	4,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-

Πίνακας 3. Παράμετροι φασματικής συνακρόασης.

- 10) Στην καρτέλα "Test Steps" (Βήματα τεστ), εισαγάγετε το πρωτόκολλο PCR (Πίνακας 4).

Step Name (Όνομα βήματος)	Profile Type (Τύπος προφίλ)	Cycles (Κύκλοι)	Time (s) (Χρόνος (δ.))	Temperature (Θερμοκρασία)	Detect (Ανίχνευση)
Reverse transcription (Αντίστροφη μεταγραφή)	Κράτηση	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Αρχική μετουσίωση)	Κράτηση	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Μετουσίωση και ανόπτηση/επέκταση (Συλλογή δεδομένων))	2-Θερμοκρασία	45	10	95°C	-
			61,1	63°C	✓

Πίνακας 4. Πρωτόκολλο PCR.

- 11) Κάντε κλικ στο κουμπί "Save Test" (Αποθήκευση τεστ).

8.3.2. Ρύθμιση ραφιών BD MAX™

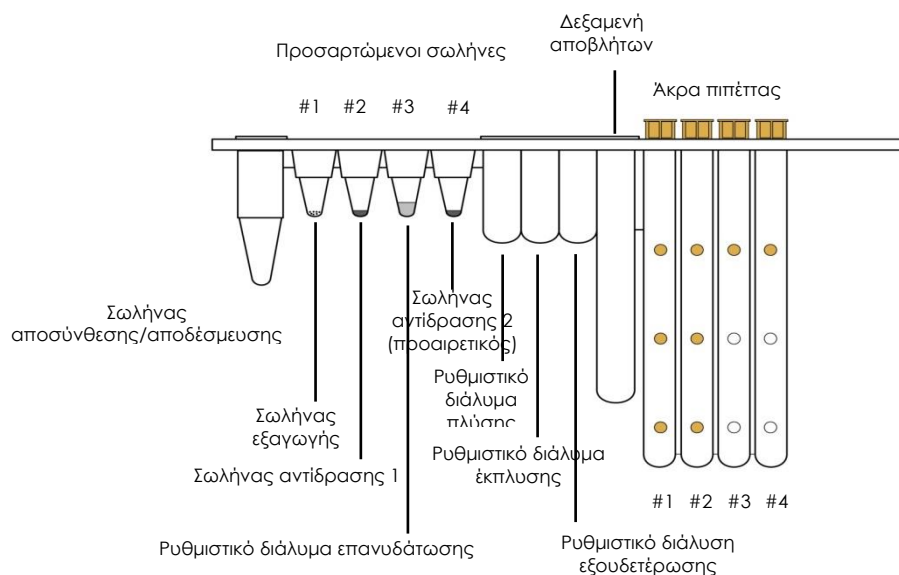
- 1) Για κάθε δείγμα προς έλεγχο, αφαιρέστε μία Ενιαία λωρίδα αντιδραστηρίου (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) από το κιτ BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Χτυπήστε απαλά κάθε λωρίδα σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα υγρά βρίσκονται στο κάτω μέρος των σωλήνων και τοποθετήστε τις στα ράφια δειγμάτων του συστήματος BD MAX™.
- 2) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων εξαγωγής BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (λευκό αλουμινόχαρτο) από το προστατευτικό σακουλάκι. Προσαρτήστε τους σωλήνες εξαγωγής (λευκό αλουμινόχαρτο) στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα TNA (Θέση προσάρτησης 1, κωδικοποίηση λευκού χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
- 3) Προσδιορίστε και διαχωρίστε τον κατάλληλο αριθμό από σωληνάρια αντίδρασης VIASURE Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (κόκκινο αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε τα στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 2, κωδικοποίηση πράσινου χρώματος στο ράφι. Βλ. Εικόνα
 - α. Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.
 - β. Για τη διεξαγωγή της σωστής επανυδάτωσης, βεβαιωθείτε ότι το λυοφιλοποιημένο προϊόν βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου.

Σημείωση: Αν επιλέξετε τη μορφή "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5))(Ενότητα 8.3.1), προσδιορίστε και διαχωρίστε τον



κατάλληλο αριθμό πρόσθετων σωλήνων αντίδρασης VIASURE (διαφορετικό αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 4, κωδικοποίηση μπλε χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.

- 4) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων Rehydration Buffer tubes (μωβ αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 3, κωδικοποίηση χωρίς χρώμα στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
 - α. Για να εκτελεστεί σωστά η μεταφορά, βεβαιωθείτε ότι το υγρό βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου.



Εικόνα 1. Λωρίδα αντιδραστήριου BD MAX™ TNA (TNA) από το kit BD MAX™ ExK TNA-3.

8.3.3. Ρύθμιση οργάνων BD MAX™

- 1) Επιλέξτε την καρτέλα "Work List" (Λίστα εργασίας) στην οθόνη "Run" (Εκτέλεση) στο λογισμικό συστήματος BD MAX™ έκδ.4.50A ή μεταγενέστερης.
- 2) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Test" (Τεστ), επιλέξτε VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* (αν δεν έχει ήδη δημιουργηθεί, ανατρέξτε στην ενότητα 8.3.1).
- 3) Επιλέξτε τον κατάλληλο αριθμό παρτίδας kit (βρίσκεται στο εξωτερικό κουτί του kit εξαγωγής που χρησιμοποιείται) από το αναπτυσσόμενο μενού (προαιρετικά).
- 4) Εισαγάγετε τον αριθμό αναγνώρισης του σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος στο παράθυρο σωλήνων δείγματος της λίστας εργασίας, είτε με σάρωση του γραμμωτού κώδικα με τον σαρωτή με χειροκίνητη καταχώριση.
- 5) Συμπληρώστε το παράθυρο δείγματος/ταυτότητας ασθενούς στο παράθυρο "Accession" (Ενταξη) της λίστας εργασίας (εάν ισχύει) και κάντε κλικ στο κουμπί "Save" (Αποθήκευση). Συνεχίστε έως ότου καταχωριστούν όλοι οι σωλήνες ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα/η ταυτότητα ασθενούς και οι σωλήνες ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος έχουν αντιστοιχιστεί με ακρίβεια.
- 6) Τοποθετήστε τον προετοιμασμένο σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος στο ράφι BD MAX™.
- 7) Τοποθετήστε το ράφι στο σύστημα BD MAX™ (Το ράφι Α τοποθετείται στην αριστερή πλευρά του συστήματος BD MAX™ και το ράφι Β στη δεξιά πλευρά).
- 8) Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό δοχείων BD MAX™ PCR Cartridge(s) στο σύστημα BD MAX™.
- 9) Κλείστε τη θύρα του συστήματος BD MAX™.



- 10) Κάντε κλικ στην επιλογή "Start Run" (Έναρξη εκτέλεσης) για να ξεκινήσει η διαδικασία.

8.3.4 Έκθεση BD MAX™

- 1) Στο κύριο μενού, κάντε κλικ στο κουμπί "Results" (Αποτελέσματα).
- 2) Κάντε διπλό κλικ στην εκτέλεση στη λίστα ή πατήστε το κουμπί "View" (Προβολή).
- 3) Κάντε κλικ στην επιλογή "Print" (Εκτύπωση) και επιλέξτε: "Run Details, Test Details and Plot..." (Λεπτομέρειες εκτέλεσης, λεπτομέρειες τεστ και ακολουθία...)
- 4) Κάντε κλικ στο κουμπί "Print or Export" (Εκτύπωση ή Εξαγωγή) στην οθόνη "Run Reports" (Εκτέλεση εκθέσεων)

9. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Για λεπτομερή περιγραφή του τρόπου ανάλυσης δεδομένων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™.

Η ανάλυση των δεδομένων γίνεται από το λογισμικό BD MAX™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το λογισμικό BD MAX™ αναφέρει τιμές Ct και καμπύλες ενίσχυσης για κάθε κανάλι ανιχνευτή κάθε δείγματος που ελέγχεται με τον ακόλουθο τρόπο:

- Η τιμή Ct 0 υποδεικνύει ότι δεν υπολογίστηκε τιμή Ct από το λογισμικό με το καθορισμένο κατώφλιο (βλ. Πίνακα 4). Η καμπύλη ενίσχυσης του δείγματος που εμφανίζει την τιμή Ct "0" πρέπει να ελεγχθεί χειροκίνητα.
- Η τιμή Ct -1 υποδεικνύει ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία ενίσχυσης.
- Οποιαδήποτε άλλη τιμή Ct πρέπει να ερμηνεύεται σε συσχέτισμό με την καμπύλη ενίσχυσης και σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας δείγματος που περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Ελέγξτε το σήμα εσωτερικού μάρτυρα για να επαληθεύσετε τη σωστή λειτουργία του μείγματος ενίσχυσης. Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει έκθεση της αποτυχίας του συστήματος BD MAX™.

Διαβάστε και αναλύστε τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο πίνακα:



Γρίπη A (475/520)	Γρίπη B (585/630)	RSV (630/665)	Εσωτερικός μάρτυρας (530/565)	Ερμηνεία
-	-	-	+	Γρίπη A, Γρίπη B και RSV Αρνητικό
+	+	+	+/-	Γρίπη A, Γρίπη B και RSV Θετικό
+	-	-	+/-	Γρίπη A Θετικό, Γρίπη B και RSV Αρνητικό
+	+	-	+/-	Γρίπη A και Γρίπη B Θετικό, και RSV Αρνητικό
+	-	+	+/-	Γρίπη A και RSV Θετικό, και Γρίπη B Αρνητικό
-	+	-	+/-	Γρίπη B Θετικό, Γρίπη A και RSV Αρνητικό
-	+	+	+/-	Γρίπη B και RSV Θετικό, Γρίπη A Αρνητικό
-	-	+	+/-	RSV Θετικό, Γρίπη A και Γρίπη B Αρνητικό
UNR	UNR	UNR	UNR	Μη επιλυμένο (UNR) Αποτέλεσμα που προέκυψε παρουσία αναστολέων στην αντίδραση PCR ή όταν προκύψει γενικό πρόβλημα (το οποίο δεν αναφέρεται από κωδικό σφάλματος) με τα βήματα επεξεργασίας ή/και ενίσχυσης δείγματος.
IND	IND	IND	IND	Ασαφές αποτέλεσμα ανάλυσης (IND). Λόγω αποτυχίας του συστήματος BD MAX™. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας οργάνου που συνδέεται με κωδικό σφάλματος.
INC	INC	INC	INC	Ατελές αποτέλεσμα ανάλυσης (INC). Λόγω αποτυχίας του συστήματος BD MAX™. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας πλήρους εκτέλεσης.

Πίνακας 5. Ερμηνεία δείγματος

+: Προέκυψε ενίσχυση

-: Δεν προέκυψε ενίσχυση

Ένα δείγμα θεωρείται θετικό εάν η τιμή Ct που λαμβάνεται είναι μικρότερη από 40. Ο εσωτερικός μάρτυρας μπορεί να εμφανίζει ή όχι ένα σήμα ενίσχυσης επειδή ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων στόχου μπορεί να προκαλέσει προτιμησιακή ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων συγκεκριμένου στόχου αντί του εσωτερικού μάρτυρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ανίχνευση του εσωτερικού μάρτυρα δεν είναι απαραίτητη.

Ένα δείγμα θεωρείται αρνητικό, εάν το δείγμα δεν εμφανίζει σήμα ενίσχυσης στο σύστημα ανίχνευσης αλλά ο εσωτερικός μάρτυρας είναι θετικός. Μια αναστολή της αντίδρασης PCR μπορεί να αποκλειστεί με την ενίσχυση του εσωτερικού μάρτυρα.

Σε περίπτωση μη επιλυμένων αποτελεσμάτων, απουσία σήματος εσωτερικού μάρτυρα σε αρνητικό δείγμα, συνιστούμε να επαναλάβετε την ανάλυση αραιώνοντας το δείγμα 1:10 ώστε να ελέγξετε για πιθανά προβλήματα αναστολής.

Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.

10. Περιορισμοί του τεστ

- Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.
- Αν και αυτή η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί με άλλους τύπους δειγμάτων, έχει επικυρωθεί με φαρυγγικά επιχρίσματα.



- Η ποιότητα του τεστ εξαρτάται από την ποιότητα του δείγματος. Πρέπει να εξαχθεί κατάλληλο RNA από κλινικά δείγματα. Η ακατάλληλη συλλογή, αποθήκευση ή/και μεταφορά δειγμάτων μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.
- Ενδέχεται να εντοπιστούν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα στόχου, κάτω από το όριο ανίχνευσης, αλλά τα αποτελέσματα ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να αναπαραχθούν.
- Υπάρχει πιθανότητα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης από Γρίπη Α, Γρίπη Β ή/και RSV, είτε από δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις RNA-στόχου είτε από μόλυνση εξαιτίας προϊόντων PCR από προηγούμενες αντιδράσεις.
- Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit μπορεί να δώσει μη επιλυμένα αποτελέσματα επειδή το δείγμα περιέχει αναστολές ή εξαιτίας της λανθασμένης επανυδάτωσης λυοφιλοποιημένου σωλήνα μείγματος αντίδρασης, ή να δώσει αδιευκρίνιστα ή ατελή αποτελέσματα λόγω αστοχίας του οργάνου, με αποτέλεσμα να χρειαστεί επανάληψη του τεστ.

11. Ποιοτικός έλεγχος

Το kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit περιέχει εσωτερικό μάρτυρα (IC) σε κάθε σωλήνα αντίδρασης, ο οποίος επιβεβαιώνει τη σωστή εκτέλεση της τεχνικής.

12. Χαρακτηριστικά απόδοσης

12.1. Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα

Η κλινική απόδοση του kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας 344 αναπνευστικά δείγματα (φαρυγγικά επιχρίσματα) από συμπτωματικούς ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με αυτά που ελήφθησαν με μια μοριακή μέθοδο ανίχνευσης (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:

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

Πίνακας 6. Συγκριτικά αποτελέσματα για τη Γρίπη Α.

Το ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων είναι >98% και το ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων >96%.

*Η χαμηλή ποσότητα template RNA σε αυτό το αναπνευστικό δείγμα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



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

Πίνακας 7. Συγκριτικά αποτελέσματα για τη Γρίπη Β.

Το ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων είναι >96% και το ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων >99%.

*Η χαμηλή ποσότητα template RNA σε αυτό το αναπνευστικό δείγμα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

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

Πίνακας 8. Συγκριτικά αποτελέσματα για τον RSV.

Το ποσοστό συμφωνίας θετικών αποτελεσμάτων είναι >84% και το ποσοστό συμφωνίας αρνητικών αποτελεσμάτων >99%.

*Η χαμηλή ποσότητα template RNA σε αυτό το αναπνευστικό δείγμα είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

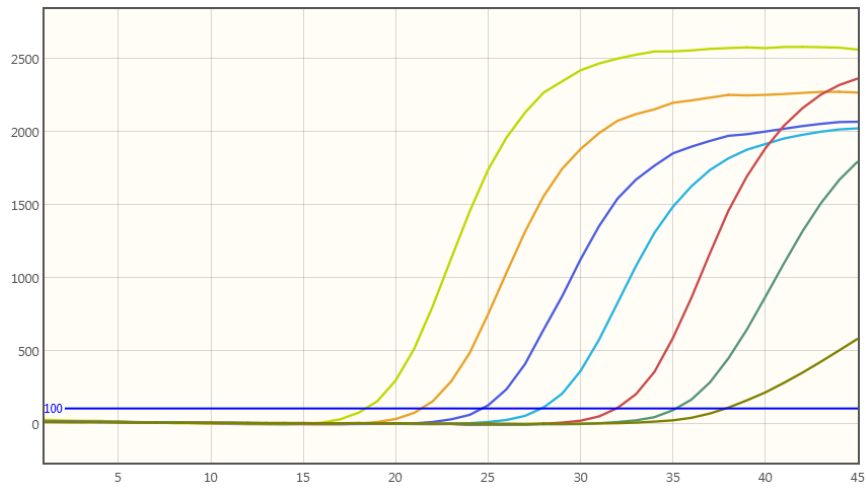
Τα αποτελέσματα δείχνουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση του ιού της Γρίπης Α, της Γρίπης Β ή/και του RSV χρησιμοποιώντας το kit ανίχνευσης VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit.

12.2. Ευαισθησία ανάλυσης

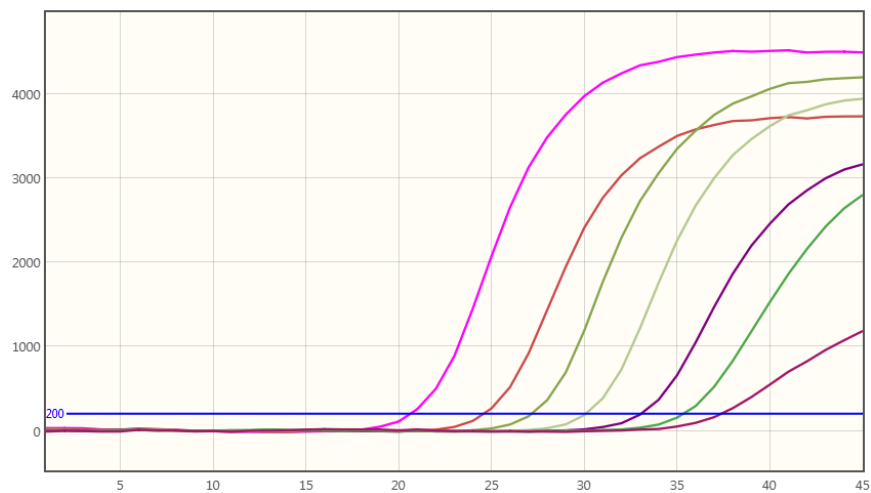
Το kit ανίχνευσης VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit έχει όριο ανίχνευσης ≥ 10 RNA αντίγραφα ανά αντίδραση για τον ιό της Γρίπης Α, της Γρίπης Β και του RSV, με ποσοστό θετικότητας $\geq 95\%$ (Εικόνα 2, 3 και 4).



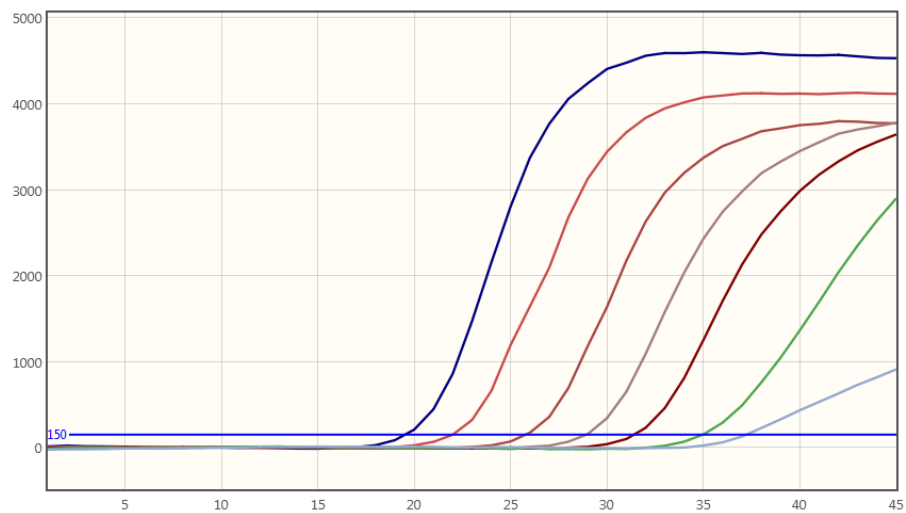
Εικόνα 2. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου Γρίπης Α (2×10^6 - 2×10^1 αντίγραφα/αντίδραση) στο σύστημα BD MAX™ (κανάλι 475/520 (FAM)).



Εικόνα 3. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου Γρίπης Β (2×10^6 - 2×10^1 αντίγραφα/αντίδραση) στο σύστημα BD MAX™ (κανάλι 585/630 (ROX)).



Εικόνα 4. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου RSV (2×10^6 - 2×10^0 αντίγραφα/αντίδραση) στο σύστημα BD MAX™ (κανάλι 630/665 (Cy5)).



12.3. Αναλυτική ειδικότητα

Η ειδικότητα της ανάλυσης για τη Γρίπη Α, τη Γρίπη Β και τον RSV επιβεβαιώθηκε εξετάζοντας ένα πάνελ αποτελούμενο από διαφορετικούς μικροοργανισμούς που αντιπροσωπεύουν τα πιο κοινά αναπνευστικά παθογόνα. Δεν ανιχνεύθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ακόλουθων μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, με εξαίρεση τα παθογόνα-στόχους κάθε ανάλυσης:

Έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Ανθρώπινος ρινοϊός	-	Ιός A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Ανθρώπινος αδενοϊός	-	Ιός Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	Κορωνοϊός MERS	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Ιός Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Ιός όμοιος με Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i> υποκατηγ. <i>aureus</i>	-	Ιός Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Ανθεκτικός στη μεθικιλίνη <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Ιός όμοιος με Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Ιός Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Ιός Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
Γονότυπος <i>Chlamydia psittaci</i> A και C	-	Ιός Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-/+	Ιός όμοιος με Influenza B/Brisbane/60/2008	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Ιός Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	-/+	Ιός Influenza B/Florida/04/06	-/+
Εντεροϊός 68 και 71	-	Ιός Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8)	-/+	Ιός Influenza B/Phuket/3073/2013	-/+
Enterovirus Echovirus τύποι 11 και 30	-	Ιός A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (κλάδος 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Ιοί ανθρώπινης παραϊνφλουένζας 1, 2, 3 και 4	-	Ιός A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (κλάδος 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός A και B	-	Ιός A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (κλάδος 3C.2a)	-/+	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV)	-/+
Ανθρώπινος κορωνοϊός 229E	-	Ιός A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	-/+		

Πίνακας 9. Παθογόνοι μικροοργανισμοί αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη.



12.4. Αναλυτική αντιδραστικότητα

Η αντιδραστικότητα του kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit για τον ιό της Γρίπης Α αξιολογήθηκε έναντι των εξής στελεχών: Ιός A/New Caledonia/20/99(H1N1), ιός A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like, ιός A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, ιός A/Perth/16/2009(H3N2)-like, ιός A/Thüringen/5/17 (H3N2), ιός A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), ιός A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2, ιός A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8), ιός A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8), ιός A/Anhui/1/2013 (H7N9), ιός 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), ιός A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (κλάδος 6B.1), ιός A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (κλάδος 3C.3a), ιός A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (κλάδος 3C.2a), ιός A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) και A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), εμφανίζοντας θετικά αποτελέσματα.

Η αντιδραστικότητα του kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit για τον ιό της Γρίπης Β αξιολογήθηκε έναντι των εξής στελεχών: Ιός B/Brisbane/60/2008-like (εξελικτική γραμμή B/Victoria), B/Florida/04/06 και B/Phuket/3073/2013 (εξελικτική γραμμή B/Yamagata), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016, εμφανίζοντας θετικά αποτελέσματα.

Η αντιδραστικότητα του kit ανίχνευσης VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit για τον ιό RSV αξιολογήθηκε έναντι του ανθρώπινου αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (RSV A και B), εμφανίζοντας θετικά αποτελέσματα.

13. Bibliography/ Βιβλιογραφία

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/ Σύμβολα για στοιχεία και αντιδραστήρια IVD

	<i>In vitro</i> diagnostic device Διαγνωστική συσκευή <i>In vitro</i>		Keep dry Διατηρήστε στεγνό		Use by Ανάλωση έως		Manufacturer Κατασκευαστής		Batch code Κωδικός παρτίδας
	Consult instructions for use Ανατρέξτε στις Οδηγίες χρήσης		Temperature limitation Περιορισμός θερμοκρασίας		Contains sufficient for <n> test Περιεχόμενο επαρκές για <n> τεστ		Sample diluent Αραιωτικό είγματος		Catalogue number Αριθμός καταλόγου

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



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC