

Real Time PCR Detection Kit

Respiratory Virus Extended Mix for BD MAX™ System

Upute za uporabu

Ove upute za uporabu odnose se na sljedeću referencu:

PROIZVOD	REFERENCA
VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444221

Tablica A1. Referenca za proizvod koji će se koristiti sa sustavom BD MAX™ System.

EN For download IFUS from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

BG За да изтеглите IFUS на други езици, моля, отидете на **certest.es/viasure/labeling**. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout IFUS v jiných jazycích, přejděte na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.

DA Hvis du vil downloade IFUS på andre sprog, kan du gå til **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, kan du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

EL Για να κατεβάσετε το IFUS σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση **certest.es/viasure/labeling**. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

HR Za preuzimanje IFUS-a s drugih jezika unesite **certest.es/viasure/labeling**. Kada ste tamo, slijedite upute za pristup jeziku koji vam je potreban. Ako trebate dodatne informacije, obratite se na: viasure@certest.es.

HU Az IFUS más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a **certest.es/viasure/labeling** weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

LT Norėdami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į **certest.es/viasure/labeling**. Ten atlikite nurodymus, kad pasiektumėte reikiamą kalbą. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu IFUS citās valodās, lūdzu, apmeklējiet **certest.es/viasure/labeling**. Pēc tam izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB For å laste ned IFUS fra andre språk, gå inn på certest.es/viasure/labeling. Når du er der, kan du følge instruksjonene for å få tilgang til det språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du kontakte: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information, vänligen kontakta: viasure@certest.es.

SK Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Keď sa tam dostanete, postupujte podľa pokynov a získajte prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

TR IFUs'u diğer dillerden indirmek için lütfen **certest.es/viasure/labeling** adresine girin. Oraya girdikten sonra, lütfen ihtiyacınız olan dile erişim için talimatları takip edin. Daha fazla bilgiye ihtiyacınız varsa, lütfen viasure@certest.es adresinden iletişime geçin.

FI Lataa suomeksi turvallinen käyttöopas osoitteesta **certest.es/viasure/labeling**. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Ako vašeg jezika nema na popisu, pogledajte **www.certest.es**. Ako vašeg jezika nema na web-mjestu, obratite se na viasure@certest.es.

Napomena: Korisnik treba obavijestiti proizvođača i nadležno tijelo države članice u kojoj ima sjedište kao korisnik i/ili pacijent o svakom ozbiljnom incidentu povezanom s proizvodom.

Sadržaj

1.	Namjena	6
2.	Sažetak i objašnjenje	6
3.	Načelo postupka	9
4.	Reagensi koji se isporučuju	10
5.	Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik	10
6.	Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja	11
7.	Mjere opreza za korisnike	12
8.	Testni postupak	14
8.1.	Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka	14
8.2.	Priprema uzoraka i ekstrakcija NA	15
8.3.	Protokol za PCR	15
8.3.1.	Kreiranje programa za testiranje PCR-om za komplet VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	16
8.3.2.	Postavljanje BD MAX™ stalka	22
8.3.3.	Postavljanje BD MAX™ instrumenta	23
8.3.4.	Izvješće o rezultatima BD MAX™	24
9.	Tumačenje rezultata	24
10.	Ograničenja testa	28
11.	Kontrola kvalitete	30
12.	Značajke analitičke učinkovitosti	31
12.1.	Analitička linearnost	31
12.2.	Analitička osjetljivost. Granica osjetljivosti testa (LoD)	33
12.3.	Mjerni raspon	34
12.4.	Točnost	34
12.4.1.	Istinitost (Vjerodostojnost)	34
12.4.2.	Preciznost	41
12.5.	Prijenos	46
12.6.	Stopa zatajenja cijelog sustava	46

12.7. Analitička specifičnost i reaktivnost	47
12.7.1. Analitička specifičnost	47
12.7.2. Analitička reaktivnost	53
12.8. Metrološka sljedivost	56
13. Značajke kliničke učinkovitosti	56
Literatura	59
Simboli za IVD komponente i reagense	61
Robni žigovi	61

HRVATSKI

1. Namjena

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System je automatizirani test na bazi RT-qPCR osmišljen za simultanu kvalitativnu detekciju RNA/DNA iz virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), humanog koronavirusa (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirusa i adenovirusa u nazofaringealnim brisevima bolesnika kod kojih postoji sumnja na respiratornu infekciju prema njihovom liječniku. Predviđeno je da se ovaj test koristi kao pomoć u dijagnosticiranju infekcije gore navedenim mikroorganizmima u kombinaciji s kliničkim znakovima i simptomima pacijenta i/ili s epidemiološkim faktorima rizika. Pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost ciljanih nukleinskih kiselina (NA), ali ne isključuju prisutnost drugih patogena koje test ne detektira. Negativni rezultati ne isključuju prisutnost ciljanih NA i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za odlučivanje o liječenju ili pružanju druge zdravstvene skrbi bolesniku. Test koristi BD MAX™ System za automatiziranu ekstrakciju RNA/DNA i naknadni RT-qPCR primjenom priloženih reagensa u kombinaciji s univerzalnim reagensima i jednokratnim potrošnim materijalima za BD MAX™ System. RNA/DNA se ekstrahira iz uzoraka. Komplementarna DNA (cDNA) se sintetizira, a DNA/cDNA se amplificira uporabom RT-qPCR te detektira uporabom specifičnih početnica i fluorescentnih reporterskih sonda za viruse SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i adenovirus.

Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i obučenog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno upućeno i educirano o tehnikama PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičkih postupaka (uključujući edukaciju o instrumentu za PCR u stvarnom vremenu (termocikler) i sustavu za ekstrakciju nukleinske kiseline).

2. Sažetak i objašnjenje

Koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma tip 2, poznatiji kao SARS-CoV-2, respiratorni je virus koji se pojavio krajem 2019. godine i uzročnik je bolesti COVID-19, koju je Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) naknadno proglasila globalnom pandemijom (Fernández-Pérez et al., 2021; Hu et al., 2021; WHO | World Health Organization, 2023a). Taj novi koronavirus je virus s jednolančanom RNA i svrstan je u obitelj *Coronaviridae*, rod beta (Fernández-Pérez et al., 2021). Infekcija SARS-CoV-2 može zahvatiti odrasle i djecu, iako su osobe starije od 60 godina te one s već postojećim zdravstvenim stanjima sklonije obolijevanju od ozbiljnijeg oblika bolesti COVID-19 (WHO | World Health Organization, 2023a). Infekcija može biti asimptomatska ili izazvati niz simptoma od niskog do visokog stupnja intenziteta i težine, vrlo sličnih gripi (CDC |, 2023; Safiabadi Tali et al., 2021).

Gripa je akutna respiratorna infekcija uzrokovana virusom influence, koja zahvaća dišni sustav i prisutna je u cirkulaciji širom svijeta (Uyeki et al., 2022; WHO | World Health Organization, 2023b). Posebno je značajna sezonska gripa, koju izazivaju sezonski virusi Influenza A i B, a oba su odgovorna za sezonske epidemije koje se obično javljaju u zimskim razdobljima u umjerenim klimama te tijekom cijele godine u tropskim područjima (Tyrrell et al., 2021; Uyeki et al., 2022; WHO | World Health Organization, 2023b). Virusni omotač, pripadnici obitelji *Orthomyxoviridae*, jednolančani su RNA virusi negativnog smisla, čija je RNA podijeljena u osam segmenata i koji kodiraju 12 virusnih proteina (Krammer et al., 2018; Uyeki et al., 2022). Virusni omotač, dobiven iz plazmatske membrane stanice domaćina, sastoji se od lipidnog dvosloja koji sadrži transmembranske proteine hemaglutinin (HA), neuraminidazu (NA), virusni nukleoprotein (NP), matrični protein (M1) i membranski protein (M2) (Krammer et al., 2018).

Respiratorni sincicijski virus (RSV) još je jedan respiratorni i sezonski virus koji pogađa donje dišne puteve u svim dobnim skupinama (WHO | World Health Organization, n.d.). Ovaj jednolančani, nesegmentirani RNA virus negativnog smisla, član obitelji *Pneumoviridae*, poznat je po tome što prvenstveno pogađa malu djecu mlađu od 2 godine, ali također može ozbiljno utjecati na odrasle osobe starije od 65 godina i/ili imunokompromitirane osobe ili osobe s određenim komorbiditetima (Abu-Raya et al., 2023; Bergeron & Tripp, 2021; WHO | World Health Organization, n.d.).

Dijagnosticiranje navedenih respiratornih bolesti predstavlja izazov jer one obično imaju slične ili iste simptome (Uyeki et al., 2022). Stoga je točna dijagnoza ključna, ne samo za utvrđivanje uzroka bolesti, već i za predviđanje epidemijskih i pandemijskih valova te ublažavanje posljedičnog utjecaja na zdravstveni i gospodarski sustav (Safiabadi Tali et al., 2021; Uyeki et al., 2022). Dostupne su mnoge vrste dijagnostičkih testova (testovi na mjestu skrbi ili brzi testovi za detekciju antigena); međutim, RT-PCR je osjetljiviji i specifičniji, te omogućuje istovremeno otkrivanje više respiratornih virusa koji istodobno cirkuliraju, čime se skraćuje vrijeme postavljanja dijagnoze (Uyeki i sur., 2022.).

Bolesti donjih dišnih puteva uzrokuju otprilike četiri milijuna smrtnih slučajeva godišnje diljem svijeta. Za to može biti odgovoran veliki broj različitih virusa, među kojima su i koronavirusi, koji pripadaju obitelji *Coronaviridae* (Friedman et al., 2018). Ti globalno rasprostranjeni virusi su veliki, omotani virusi koji sadrže jednolančani RNA genom pozitivnog polariteta (Lim et al., 2016; Zeng et al., 2018). Izravno su povezani s bolestima dišnog sustava, gastrointestinalnog trakta i središnjeg živčanog sustava. Koronavirusi su karakteristični po svojoj podjeli na tri serotipa ili skupine. Skupine 1 i 2 odnose se na koronavirus sisavaca, dok skupina 3 obuhvaća koronavirus ptica. Uobičajeni ljudski koronavirusi su sojevi HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1 (Zeng et al., 2018). HCoV-ove je teško detektirati uobičajenim dijagnostičkim metodama jer se obično istovremeno detektiraju s drugim respiratornim virusima, kao što su HRSV ili virusi influence (Gaunt et al., 2010). S obzirom na sve navedeno, lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (Real Time PCR) jedna je od preferiranih metoda za dijagnosticiranje koronavirusa zbog

svoje specifičnosti. Konkretnije, PCR u stvarnom vremenu koristi gen *N* kao cilj za sojeve 229E, OC43 i NL63, te gen *rep* za soj HKU1.

Virusi parainfluenca (PIV ili HPIV u ljudi) pripadaju obitelji *Paramyxoviridae* i genetski i antigenski su klasificirani u četiri tipa. Ti virusi mogu uzrokovati respiratorne infekcije u dojenčadi, djece i odraslih, pri čemu se vrsta infekcije i specifični simptomi razlikuju ovisno o tipu virusa. HPIV-1 i HPIV-2 uzrokuju bolesti gornjih i donjih dišnih puteva, poput prehlade i laringotraheobronhitisa, pri čemu je HPIV-1 najčešće prisutan u djece. HPIV-3 je češće povezan sa stanjima donjih dišnih puteva poput bronhiolitisa, bronhitisa i upale pluća. HPIV-4 je rjeđe prepoznat, ali ipak može uzrokovati blage do teške respiratorne bolesti (Henrickson, 2003). Virus parainfluenca su virusi srednje veličine s omotačem, a njihovi su genomi organizirani kao jednolančana RNA negativnog smisla koja kodira najmanje šest zajedničkih strukturnih proteina. Ti virusi nose dva glikoproteina na omotaču: HN, koji sadrži hemaglutininsku i neuraminidaznu aktivnost, i F, koji ima funkciju fuzije (Henrickson, 2003).

Virusna kultura u kombinaciji s imunofluorescencijom tradicionalna je metoda dijagnosticiranja, ali je vremenski zahtjevna (Templeton et al., 2004). Testovi detekcije antigena široko se koriste, ali su manje osjetljivi i specifični od drugih dijagnostičkih alata kao što su testovi PCR u stvarnom vremenu (Jansen et al., 2011; Templeton et al., 2004), koji se trenutno smatraju jednim od najboljih metoda izbora.

Adenovirusi pripadaju obitelji *Adenoviridae*, neomotanih i dvolančanih virusa (dsDNA) (Datta, 2023; Ison & Hayden, 2016). Postoji više od 50 imunološki različitih serotipova humanog adenovirusa (Lynch & Kajon, 2016) klasificiranih u 7 vrsta (od Adenovirus-A do Adenovirus-G) koji mogu uzrokovati infekcije u ljudi, od respiratornih bolesti (Adenovirus-E, C i neke vrste skupine B) do infekcija probavnog trakta (uglavnom vrste Adenovirus-A i F), infekcija mokraćnog sustava (druge vrste iz skupine Adenovirus-B) i konjunktivitisa (Adenovirus-D) (Buckwalter et al., 2012; Datta, 2023). Prijenos može nastati udisanjem aerosoliziranih kapljica, izravnom inokulacijom konjunktive, fekalno-oralnim putem ili izlaganjem zaraženom tkivu ili krvi (Ison & Hayden, 2016).

Ljudski metapneumovirusi pripadaju obitelji *Paramyxoviridae* (Schuster & Williams, 2013) i važan su uzrok infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Metapneumovirus je omotani virus s jednolančanom RNA negativnog smisla. Klinički simptomi metapneumovirusa uključuju kašalj, vrućicu, začepljenost nosa i otežano disanje, a mogu napredovati do bronhiolitisa ili upale pluća (Uddin & Thomas, 2020). Metapneumovirus se uglavnom prenosi zaraznim kapljicama u zraku, a zabilježen je kao drugi najčešće pronađeni virus kod respiratornih infekcija, pri čemu su djeca mlađa od pet godina najosjetljivija na infekciju (Schuster & Williams, 2013).

Uspostavljanje dijagnoze može se pokazati problematičnim, jer širok spektar patogena može izazvati akutne respiratorne infekcije koje imaju slične kliničke sindrome. U početku su identificirani uzgojem u staničnim kulturama, ali dijagnoza ovim postupkom je vremenski zahtjevna zbog čekanja na razvoj citopatskog učinka. Serološki testovi mogu biti korisni u epidemiološkim istraživanjima, ali imaju ograničenu praktičnu vrijednost

kod pojedinačnih pacijenata (Datta, 2023; Ison & Hayden, 2016; Lynch & Kajon, 2016; Schuster & Williams, 2013). Stoga je PCR u stvarnom vremenu trenutno metoda koja se koristi za identifikaciju adenovirusa i metapneumovirusa zbog svoje visoke osjetljivosti i specifičnosti.

3. Načelo postupka

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System je osmišljen za simultanu kvalitativnu detekciju nukleinske kiseline iz virusa SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), humanog koronavirusa (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirusa i adenovirusa u nazofaringealnim brisevima. Detekcija se obavlja u obliku RT-qPCR, koji se sastoji od jednog koraka, gdje se reverzna transkripcija i potom amplifikacija specifične ciljane sekvence vrši u istoj reakcijskoj epruveti. Ciljana izolirana RNA transkribira se u komplementarnu DNA reverznom transkriptazom. Nakon što se sintetizira cDNA ili izolira DNA, identifikacija tih mikroorganizama obavlja se amplifikacijom konzervirane regije gena *N* i *ORF1ab* virusa SARS-CoV-2, gena *M* (matrični protein (M1)) za virus Influenza A/B, gena *HA* za virus Influenza A podtip H1N1, gena *N* virusa RSV (tipovi A i B), gena *HN* virusa parainfluenza (tipovi 1, 2 i 3), gena *F* virusa parainfluenza (tip 4), gena *N* koronavirusa (229E, NL63, HKU1 i OC43), gena *F* metapneumovirusa i gena *hexon* adenovirusa, uporabom specifičnih početnica i fluorescentno označenih sonidi.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System temelji se na djelovanju 5' egzonukleaze u DNA polimerazi. Tijekom amplifikacije DNA taj enzim rascjepljuje sondu vezanu za sekvencu komplementarne DNA, čime se razdvaja supresorsku boju od reportera. Ta reakcija dovodi do povećanja fluorescencijskog signala srazmjernog količini ciljnog predloška. Ta fluorescencija mjeri se na sustavu BD MAX™ System.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sadrži u svakoj epruveti sve potrebne komponente za test PCR u stvarnom vremenu (specifične početnice/sonde, dNTP-ove, pufer, polimerazu i reverznu transkriptazu) u stabiliziranom¹ formatu, kao i **endogenu unutarnju kontrolu (EIC)** (gen humane *RNAse P*) za praćenje procesa ekstrakcije i/ili isključivanja inhibicije aktivnosti polimeraze. Ljudski domaćinski geni uključeni su u osnovno održavanje stanice te se stoga očekuje da će biti prisutni u svim ljudskim stanicama s jezgrom te održavati relativno stalne razine ekspresije.

¹ Imajte na umu da se pojmovi „stabiliziran” i „liofiliziran” koriste jednako i kao sinonimi u cijelom dokumentu.

	Cilj	Kanal	Gen
<i>Respiratory Virus Mix I</i>	SARS-CoV-2	475/520	Gen <i>N</i> i <i>ORF1ab</i>
	Influenza B	530/565	Gen <i>M1</i>
	Influenza A	585/630	Geni <i>M1</i> i <i>HA</i>
	RSV (A/B)	630/665	Gen <i>N</i>
	Endogena Interna kontrola (EIC)	680/715	Gen humani <i>RNaze P</i>
<i>Respiratory Virus Mix II</i>	Parainfluenza (tipovi 1, 2 i 3)	475/520	Gen <i>HN</i>
	Parainfluenza (tip 4)		Gen <i>F</i>
	Koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43)	530/565	Gen <i>N</i>
	Metapneumovirus	585/630	Gen <i>F</i>
	Adenovirus	630/665	Gen <i>Hexon</i>
	Endogena Interna kontrola (EIC)	680/715	Gen humani <i>RNaze P</i>

Tablica 1. Cilj, kanal i geni.

4. Reagensi koji se isporučuju

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System uključuje sljedeće materijale i reagense detaljno opisane u Tablici 2:

Reagens/materijal	Opis	Raspon koncentracije	Crtni kod	Količina
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Lioprotektori i stabilizatori	±6 g/100 ml*	1K folija	2 vrećice sa 12 prozirnih epruveta
	Nukleotidni trifosfat (dNTPs)	±1 mM*		
	Početnice i sonde	0,2 – 1 nMol/μL*		
	Enzimi	10 – 100 U/rxn*		
<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube	Lioprotektori i stabilizatori	±6 g/100 ml*	1M folija	2 vrećice sa 12 prozirnih epruveta
	Nukleotidni trifosfat (dNTPs)	±1 mM*		
	Početnice i sonde	0,2 – 1 nMol/μL*		
	Enzimi	10 – 100 U/rxn*		
Rehydration Buffer tube	Mješavina fiziološke otopine	±13 mM	11 folija	1 vrećica sa 24 prozirne epruvete
	Pufer (TRIS, pH)	±67 mM		

Tablica 2. Reagensi i materijali osigurani u kompletu za detekciju VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System s kat. br. 444221.

*Za komponentu u stabiliziranom formatu, raspon koncentracije znači nakon rehidracije.

5. Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik

Sljedeći popis uključuje materijale i opremu koja je neophodna za korištenje, ali nije dio VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument za PCR u stvarnom vremenu: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ili 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).

- Vortex.
- Mikropipete (precizne u rasponu od 2 do 1000 µL).
- Voda koja ne sadrži nukleazu.
- Nastavci za filter.
- Nenaprašene jednokratne rukavice.

Neobavezno:

- Vanjski kontrolni materijali mogu se koristiti kao dio postupka kontrole kvalitete rada testa. Komercijalno dostupni kontrolni materijal i/ili uzorci prethodno okarakterizirani kao pozitivni ili negativni mogu se koristiti kao vanjska pozitivna kontrola (EPC) ili vanjska negativna kontrola (ENC). Odabir i validiranje EPC-a i ENC-a mora se obaviti u skladu s primjenjivim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima i standardnim postupcima kontrole kvalitete laboratorija. Osim toga, prilikom korištenja komercijalno dostupnog kontrolnog materijala, korisnik mora slijediti odgovarajuće upute za uporabu.

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System validiran je korištenjem ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 ili 442828) na instrumentu za PCR u stvarnom vremenu BD MAX™ System.

Uzorci odabrani za evaluaciju proizvoda bili su nazofaringealni (NF) uzorci prikupljeni korištenjem fleksibilnog najlonskog sterilnog brisa (u daljnjem tekstu nazofaringealni bris). Nakon toga, bris se stavlja u epruvetu sustava BD™ Universal Viral Transport System (UVT, SKU: 220220) ili Universal Transport Media® (UTM®) (Copan).

6. Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja

- Kompleti se mogu transportirati i čuvati na temperaturi od 2 do 30 °C do isteka roka valjanosti navedenog na naljepnici kompleta.
- Izbjegavajte vibracije tijekom transporta kako ne bi došlo do curenja tekućine.
- Nakon otvaranja aluminijskih vrećica koje sadrže reakcijske epruvete, proizvod se može iskoristiti u roku od 28 dana na temperaturi 2 – 30 °C. Držite bočicu podalje od svjetlosti.

Sljedeća tablica prikazuje sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje kompleta u cjelini i svake pojedine komponente:

Komponenta	Uvjeti transporta	Uvjeti skladištenja	Uvjeti tijekom korištenja
Kompletan VIASURE <i>Respiratory Virus Extended Mix</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	Prije korištenja: 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	<i>*Pogledajte uvjete tijekom korištenja za svaku komponentu.</i>
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube (1K folija)		Prije korištenja: 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom: 2 – 30°C do 28 dana.	Sobna temperatura.
<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube (1M folija)		Prije korištenja: 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom: 2 – 30°C do 28 dana.	Sobna temperatura.
Rehydration Buffer tube		Prije korištenja: 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom: 2 – 30°C do 28 dana.	Sobna temperatura.

Tablica 3. Sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System i svake komponente.

7. Mjere opreza za korisnike

- Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i educiranog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno educirano i osposobljeno za tehnike PCR-a u stvarnom vremenu i postupaka dijagnostike *in vitro*.
- Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Upute za uporabu proizvoda VIASURE i korisnički priručnik za BD MAX™ System moraju se pažljivo pročitati prije korištenja kompleta VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Nemojte obavljati test dok ne shvatite informacije o postupcima, sigurnosnim mjerama opreza i ograničenjima opisanim u njima.
- Nemojte koristiti reagense i/ili materijale kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti komplet ako je potrgana naljepnica kojom je zatvorena vanjska kutija.
- Nemojte koristiti reagense ako je zaštitna kutija otvorena ili oštećena po prispjeću.
- Nemojte koristiti reagense ako su zaštitne vrećice otvorene ili oštećene po prispjeću.
- Nemojte koristiti reagense ako desikant u vrećicama s reagensima nije prisutan ili je oštećen.
- Nemojte vaditi desikant iz vrećica s reagensima.
- Nemojte koristiti reagense ako je folija potrgana ili oštećena.
- Nemojte miješati reagense iz različitih vrećica, kompleta i/ili serija.
- Nakon svake upotrebe odmah zatvorite zaštitne vrećice s reagensima pomoću patentnog zatvarača radi zaštite glavne smjese od sunčeve svjetlosti. Prije zatvaranja istisnite višak zraka iz vrećica.
- Zaštitite reagense protiv vlage. Duže izlaganje vlazi može utjecati na učinkovitost proizvoda.
- Kako ne bi došlo do oštećenja naljepnice, nemojte koristiti proizvod u blizini otapala.

- Izgled reakcije smjese u stabiliziranom formatu koji se obično nalazi na dnu epruvete razlikuje se od uobičajenog (bez stožastog oblika, inhomogeni, manji/veći i/ili bojom različit od bjeličastog) ne mijenja funkcionalnost testa.
- Pazite da su reakcijska epruveta i epruveta s rehidracijskim puferom sigurno postavljene na svoje mjesto prilikom postavljanja stalka BD MAX™ System.
- U slučajevima gdje se drugi testovi PCR-om obavljaju u istom općem prostoru laboratorija potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kompleta za ekstrakciju BD MAX™ ExK™ TNA-3 te svih dodatnih reagensa potrebnih za testiranje i sustava BD MAX™ System. Svakako izbjegavajte kontaminaciju reagensa s mikrobima i ribonukleazama (RNaze)/deoksiribonukleazama (DNaze). Preporučuje se uporaba jednokratnih, sterilnih vrhova volumetrijskih pipeta ili otpornih na aerosol, bez RNaze/DNaze. Koristite novi vrh sa svakim uzorkom. Rukavice se moraju promijeniti prije rukovanja reagensima i patronama (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Radi sprječavanja kontaminacije okruženja amplikonima, nemojte odvajati PCR patronu BD MAX™ Cartridge nakon uporabe. Brtve na PCR patroni BD MAX™ Cartridge dizajnirane su za sprječavanje kontaminacije.
- Koristite jednosmjerni radni proces. Treba započeti u području za ekstrakciju, a zatim preći u područje za amplifikaciju i detekciju. Nemojte vraćati uzorke, opremu i reagense u područje u kojem je obavljen prethodni korak.
- Pridržavajte se dobre laboratorijske prakse. Nosite zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice, zaštitne naočale i masku. Nemojte jesti, piti, pušiti niti nanositi kozmetičke proizvode u radnom prostoru. Operite ruke nakon što završite test.
- Uzorci se moraju smatrati potencijalno zaraznima i/ili biološki opasnima, a isto vrijedi za reagense i materijale koji su bili izloženi uzorcima i mora se njima rukovati u skladu s nacionalnim sigurnosnim propisima. Poduzmite neophodne mjere opreza prilikom prikupljanja, transporta, pohrane, rukovanja i odlaganja uzoraka u otpad.
- Uzorcima i reagensima potrebno je rukovati u biološkom zaštitnom kabinetu. Koristite osobnu zaštitnu opremu (OZO) u skladu s važećim smjernicama za rukovanje potencijalno zaraznim uzorcima. Zbrinite otpad u skladu s lokalnim i državnim propisima.
- Preporučuje se redovita dekontaminacija opreme koja se često koristi, naročito mikropipeta i radnih površina.
- U skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006. (REACH), kompleti VIASURE Real Time PCR Detection Kit za BD MAX™ System ne zahtijevaju sigurnosne listove (Safety Data Sheets) zbog njihove klasifikacije kao neopasni za zdravlje i okoliš jer ne sadrže tvari i/ili smjese koje udovoljavaju kriterijima za razvrstavanje opasnosti dostupne u Uredbi (EZ) br. 1272/2008. (CLP) ili koje su u koncentracijama višim od vrijednosti utvrđene u spomenutoj uredbi za njihovo prijavljivanje. Tvrtki Certest Biotec S.L. može se podnijeti zahtjev za izdavanje izjave kojom se potvrđuje da nije potreban sigurnosni list (Safety Data Sheet).

- Pazite da je definicija programa testa za PCR na sustavu BD MAX™ System napravljena prema uputama u odjeljku „Protokol za PCR” (parametri ekstrakcije uzorka, zadani crtični kodovi, postavke za PCR itd.).
- Posavjetujte se s Korisničkim priručnikom za sustav BD MAX™ System u vezi s dodatnim upozorenjima, mjerama opreza i postupcima.
- Potvrda o analizi nije priložena uz uređaj, no može se preuzeti s web-mjesta Certest Biotec S.L. (www.certest.es) u slučaju potrebe.

8. Testni postupak

8.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka

VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System testiran je na nazofaringealnim brisevima prikupljenim sterilnim fleksibilnim najlonskim brisom koji se odmah stavlja u sterilnu epruvetu koja sadrži 3 ml proizvoda BD™ Universal Viral Transport System (UVT, SKU: 220220)² ili Universal Transport Media® (UTM®) (Copan)³. Drukčije vrste uzoraka mora validirati korisnik.

Prikupljanje, pohrana i transport uzoraka treba obavljati u uvjetima koje je validirao korisnik. Općenito, kliničke uzorke treba prikupiti i označiti na odgovarajući način u čiste spremnike s transportnim medijem ili bez njega (ovisno o vrsti uzorka). Nakon prikupljanja, uzorke treba staviti u vrećicu s oznakom bioopasnosti te ih treba transportirati i obraditi što je prije moguće da bi se zajamčila kvaliteta testa. Uzorci se trebaju transportirati na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata, ili na temperaturi od 4 °C tijekom 5 dana u skladu s lokalnim i nacionalnim propisima za transport patogenih materijala. Za dugotrajni transport (duži od 5 dana) preporučujemo otpremanje na temperaturi od -20 °C ili nižoj⁴. Uzorci prikupljeni za molekularno testiranje moraju se čuvati u kontroliranim uvjetima kako se nukleinske kiseline ne bi razgradile tijekom skladištenja. Preporučuje se korištenje svježih uzoraka za test, ali u slučaju da to nije moguće ili u slučaju retrospektivne studije, uzorke treba pohraniti na temperaturi od -70 ili -80 °C, a kao druga opcija, na temperaturi od -20 °C⁵. Treba izbjegavati ponovljene cikluse zamrzavanja i odmrzavanja kako bi se spriječila razgradnja uzorka i nukleinskih kiselina.

² BD universal viral transport system. <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-universal-viral-transport-system>

³ <https://www.copangroup.com/product-ranges/utm/>

⁴ IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

⁵ Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. & Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* 37, 127–134 (2019).

Klinički uzorci moraju se prikupljati, transportirati i pohraniti u skladu s odgovarajućim laboratorijskim smjernicama i/ili priručnicima o pravilima laboratorija. Kao primjere, pogledajte smjernicu Američkog društva za zarazne bolesti (IDSA) (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) ili Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J., & Orta Mira, N. (2019). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>.

Napomena: Gore navedeni uvjeti prikupljanja, transporta i čuvanja uzoraka predloženi su na temelju preporuka za nazofaringealne uzorke namijenjene detekciji nukleinskih kiselina, kako je navedeno u referentnom izvješću preporuka SEIMC-a za opće postupke prikupljanja i transporta u kliničkoj mikrobiologiji i mjerodavnom vodiču IDSA-a. Ipak, preporučujemo da se pridržavate smjernica laboratorija i/ili priručnika o pravilima laboratorija za pravilni transport i očuvanje uzoraka.

Interna studija stabilnosti uzoraka provedena je s VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System korištenjem negativnog nazofaringealnog brisa prikupljenog u sustavu BD™ Universal Viral Transport System pozitivnog na ciljeve proizvoda, svaki soj u koncentraciji od 2 – 3xLoD. Stabilnost je analizirana pomoću tri različita testa: primarna stabilnost (25 °C: 24 i 48 sati; 4 °C: 1, 2 i 7 dana; -20 °C: 2, 3 i 6 mjeseci), stabilnost u epruveti s puferom za uzorak (3 i 7 dana na 25 °C i 4 °C) i ugniježđena stabilnost (uzorci su inkubirani na 4 °C i 25 °C tijekom 48 sati, nakon čega su dodani u epruvetu s puferom za uzorak i analizirani nakon 3 i 7 dana na 4 °C i 25 °C). Osim toga, uzorci su analizirani nakon prolaska kroz pet ciklusa zamrzavanja (na -20 °C) i odmrzavanja (na 25 °C) tijekom jednog tjedna. Rezultati su pokazali dobru učinkovitost pohranjenih uzoraka u svim testiranim uvjetima.

8.2. Priprema uzoraka i ekstrakcija NA

Prikupljanje uzorka obavite u skladu s preporukama iz uputa za uporabu kompleta za ekstrakciju koji koristite, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetom prenesite 400 µL uzorka u epruvetu BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube te je zatvorite čepom s membranom. Izmiješajte uzorak vrtloženjem pri visokoj brzini tijekom 1 minute. Pobrinite se da se vrtloženje obavi nekoliko minuta prije pokretanja postupka. Pređite na rad s BD MAX™ System Operation.

Imajte na umu da korisnik treba razviti i validirati postupke pripreme ekstrakcije specifične za primjenu te da neki drugi uzorci mogu zahtijevati prethodnu obradu.

8.3. Protokol za PCR

Napomena: Detaljne upute potražite u Korisničkom priručniku za sustav BD MAX™ System.

8.3.1. Kreiranje programa za testiranje PCR-om za komplet VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Napomena: Ako ste već kreirali test za komplet *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System možete preskočiti korak 8.3.1 i preći izravno na 8.3.2.

- 1) Na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System odaberite karticu „Test Editor“ (Uređivač testa).
- 2) Kliknite na gumb „Create“ (Kreiraj).

Na kartici „Basic Information“ (Osnovne informacije):

- 3) U polju „Test Name“ (Naziv testa) dajte ime svom testu, npr. VIASURE Resp Virus.

Napomena: Naziv testa mora biti jedinstven i smije imati najviše dvadeset znakova.

- 4) S padajućeg izbornika „Extraction Type“ (Vrsta ekstrakcije) odaberite „ExK TNA-3“.
- 5) Na padajućem izborniku "Master Mix Format" (Glavni format smjese) odaberite "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dvojna glavna smjesa koncentriranog liofilizata MM s rehidracijskim puferom (tip 5)). Kada se odabere Dual Master Mix (Dvojna glavna smjesa), konfiguracija kartice s desne strane kartice „Test Editor“ (Uređivač testa) mijenja se. Pojavljuju se dodatne kartice za „PCR settings“ (Postavke za PCR), „Melt settings“ (Postavke taljenja) i „Test Steps“ (Koraci testa) uzimajući u obzir obje snap-in epruvete.
- 6) U polju „Sample Extraction Parameters“ (Parametri ekstrakcije uzorka) odaberite „User Defined“ (Korisnički definirani) i prilagodite vrijednosti sljedećih parametara (tablica 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametri ekstrakcije uzorka)	<i>Value (units)</i> (Vrijednost (jedinice))
<i>Lysis Heat Time</i> (Vrijeme toplinske lize)	10 min
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura lize)	60 °C
<i>Sample Tip Height</i> (Visina vrha za uzorak)	1600 koraka
<i>Sample Volume</i> (Volumen uzorka)	950 µL
<i>Wash Volume</i> (Volumen ispiranja)	500 µL
<i>Neutralization Volume</i> (Volumen neutralizacije)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Vrijeme zagrijavanja za DNasu)	N/A

Tablica 4. Parametri ekstrakcije uzorka izvedene s BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) U polju „Ct Calculation“ (Ct izračun) odaberite „Call Ct at Threshold Crossing“ (Izračunaj Ct pri prelasku granice).
- 8) Na radnom softveru verzije 5.00 ili više te sa snap-in epruvetama s crtičnim kodom, u polju „Custom Barcodes“ (Zadani crtični kodovi) odaberite sljedeću konfiguraciju:
 - a. „Snap-In 2 Barcode“ (Snap-In 2 crtični kod): 1K (u vezi epruvete *Respiratory Virus Mix I* reaction tube).

- b. „Snap-In 3 Barcode“ (Snap-In 3 crtični kod): 11 (u vezi epruvete Rehydration Buffer tube).
- c. „Snap-In 4 Barcode“ (Snap-In 4 crtični kod): 1M (u vezi epruvete *Respiratory Virus Mix II* reaction tube).

Na karticama „PCR Settings“ (Postavke za PCR):

- 9) U polje „PCR Settings“ (Postavke za PCR) unesite sljedeće parametre opisane u Tablicama 5 i 6 za snap-in epruvetu 2 (zeleno označenu na stalku) i snap-in epruvetu 4 (plavo označenu na stalku): „Alias“ (Drugi naziv) (do sedam alfanumeričkih znakova), „PCR Gain“ (Dobit PCR-a), „Threshold“ (Prag), „Ct Min“ i „Ct Max“ (Ct Maks).

Channel (Kanal)	Alias (Drugi nazivi)	PCR Gain (Dobit PCR-a)	Threshold (Prag)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Maks)
475/520 (FAM)	SARS	80	150	0	40
530/565 (HEX)	FLUB	40	150	0	40
585/630 (ROX)	FLUA	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tablica 5. „PCR settings“ (Postavke za PCR) za snap-in 2.

Channel (Kanal)	Alias (Drugi nazivi)	PCR Gain (Dobit PCR-a)	Threshold (Prag)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Maks)
475/520 (FAM)	HPIV	60	150	0	40
530/565 (HEX)	HCOV	40	150	0	40
585/630 (ROX)	MPV	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	HADV	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tablica 6. „PCR settings“ (Postavke za PCR) za snap-in 4.

Napomena: Preporučuje se postavljanje gore navedenih minimalnih graničnih vrijednosti za svaki kanal kao početnu točku, ali završne postavke mora odrediti krajnji korisnik tijekom tumačenja rezultata kako bi se osiguralo da granice spadaju u eksponencijalnu fazu krivulja fluorescencije i iznad bilo kojeg pozadinskog signala. Granična vrijednost različitih instrumenata može se razlikovati zbog različitih intenziteta signala.

- 10) U polje „Color compensation“ (Kompenzacija boje) unesite sljedeće parametre (Tablica 7 i 8).

		False Receiving Channel (Kanal s lažnim rezultatima)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanal za pobuđivanje)	475/520	-	4	0	0	0	0
	530/565	1	-	0	0	0	0
	585/630	0	0	-	1	0	0
	630/665	0	0	3	-	18	0
	680/715	0	0	0	1,5	-	0

Tablica 7. Parametri „Color compensation“ (Kompenzacija boje) za snap-in 2.

		False Receiving Channel (Kanal s lažnim rezultatima)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanal za pobuđivanje)	475/520	-	0	0	0	0	0
	530/565	0	-	0	0	0	0
	585/630	0	0	-	3	0	0
	630/665	0	0	5	-	19	0
	680/715	0	0	0	3	-	0

Tablica 8. Parametri „Color compensation“ (Kompenzacija boje) za snap-in 4.

Na karticama „Melt Settings“ (Postavke taljenja) nije potrebna nikakva radnja, ne primjenjuje se na ovaj proizvod.

Na kartici „Test Steps“ (Koraci testa):

- 11) Unesite naziv koraka (do dvadeset znakova) i postavite sljedeće parametre za definiranje svakog koraka protokola za PCR: „Profile Type“ (Vrsta profila), „Cycles“ (Ciklusi), „Time“ (Vrijeme) i „Temperature“ (Temperatura) te odaberite polje „Detect“ (Detekcija) za definiranje koraka detekcije (Tablica 9). Kliknite na gumb „Add“ (Dodaj) za dodavanje novog koraka i ponavljajte postupak dok ne definirate sve potrebne korake.

Napomena: Polje „Type“ (Vrsta) mora biti prazno.

<i>Step</i> (Korak)	<i>Step name</i> (Naziv koraka)	<i>Profile Type</i> (Vrsta profila)	<i>Cycles</i> (Ciklusi)	<i>Time (s)</i> (Vrijeme (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Detekcija)
Reverse transcription (Reverzna transkripcija)	RV-transcription	<i>Hold</i>	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Početna denaturacija)	IN-denaturation	<i>Hold</i>	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacija i sparivanje/produljenje (prikupljanje podataka))	Annealing/Extension	<i>2-Temperature</i>	45	10	95 °C	-
				61,1	63 °C	✓

Tablica 9. Protokol za PCR za snap-in 2 i snap-in 4.

Na kartici „Result Logic“ (Logika rezultata):

- 12) U polju „Target“ (Cilj) imenujte svoj cilj: tj. SARS (do sedam alfanumeričkih znakova). Ponavljajte korake 12 – 15 za svaki cilj (tj. SARS, FLUB, FLUA i RSV za snap-in 2 ili HPIV, HCOV, MPV i HADV za snap-in 4) slijedeći tablice specifične za cilj koji se definira.

Napomena: Odaberite snap-in 2 (zeleno) u padajućem izborniku „Master Mix“ (Glavna smjesa) da biste postavili logiku rezultata za prvu reakcijsku smjesu i snap-in 4 (plavo) za drugu reakcijsku smjesu. Nazivi ciljeva moraju biti različiti za snap-in 2 i snap-in 4.

- 13) Kliknite na potvrdni okvir „Analyze“ (Analiziraj) za uključivanje željenih valnih duljina (kanali za PCR) u analizu ciljnog rezultata (Tablice 10 – 13 za snap-in 2 i tablice 14 – 17 za snap-in 4).

Prva glavna smjesa (*Respiratory Virus Mix I* reaction tube): Snap-in 2 (zeleno).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
475/520	SARS	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 10. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj SARS (SARS-CoV-2).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
530/565	FLUB	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 11. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj FLUB (Influenza B).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
585/630	FLUA	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 12. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj FLUA (Influenza A).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
630/665	RSV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 13. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj RSV (respiratorni sinicijski virus tipovi A i B).

Druga glavna smjesa (*Respiratory Virus Mix II* reaction tube): Snap-in 4 (plavo).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
475/520	HPIV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 14. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj HPIV (parainfluenza tipovi 1, 2, 3 i 4).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
530/565	HCOV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 15. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj HCOV (koronavirus 229E, NL63, HKU1 i OC43).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
585/630	MPV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 16. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj MPV (metapneumovirus).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi nazivi)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
630/665	HADV	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 17. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj HADV (adenovirus).

14) Kliknite na gumb „Edit Logic“ (Uredi logiku).

15) U prozoru „Edit Logic“ (Uredi logiku) navedene su sve kombinacije vrsta rezultata. Za svaki redak u padajućem izborniku „Result“ (Rezultat) odaberite rezultat koji se prikazuje kada su ispunjeni uvjeti u tom retku, slijedeći tablice 18 – 21 za snap-in 2 i tablice 22 – 25 za snap-in 4.

Prva glavna smjesa (*Respiratory Virus Mix* / reaction tube): Snap-in 2 (zeleno)

<i>Result</i> (Rezultat)	SARS (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 18. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj SARS (SARS-CoV-2). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	FLUB (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 19. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj FLUB (Influenza B). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	FLUA (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 20. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj FLUA (Influenza A). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	RSV (630/665)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 21. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj RSV (respiratorni sinicijski virus tipovi A i B). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Napomena: Prema prethodno definiranom Ct Max (tablica 5):

- Rezultat za kanale SARS (475/520), FLUB (530/565), FLUA (585/630) ili RSV (630/665) smatra se „Valid“ (Valjanim) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 40 ; a „Invalid“ (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 40 .
- Rezultat za kanal EIC (680/715) smatra se „Valid“ (Valjanim) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 35 ; a „Invalid“ (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 35 .

Druga glavna smjesa (*Respiratory Virus Mix II* reaction tube): Snap-in 4

<i>Result</i> (Rezultat)	HPIV (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 22. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj HPIV (parainfluenca tipovi 1, 2, 3 i 4). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	HCOV (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 23. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj HCOV (koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	MPV (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 24. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj MPV (metapneumovirus). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	HADV (630/665)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 25. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj HADV (adenovirus). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Napomena: Prema prethodno definiranom Ct Max (tablica 6):

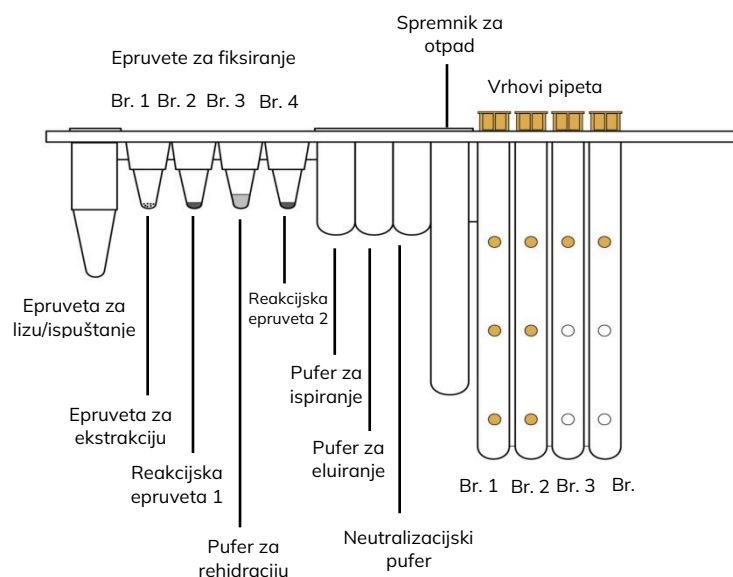
- i. Rezultat za kanale HPIV (475/520), HCOV (530/565), MPV (585/630) ili HADV (630/665) smatra se „Valid” (Valjanim) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 40 ; a „Invalid” (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 40 .
- ii. Rezultat za kanal EIC (680/715) smatra se „Valid” (Valjanim) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 35 ; a „Invalid” (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 35 .

16) Kliknite na gumb „Save” (Spremi) da biste spremili test.

8.3.2. Postavljanje BD MAX™ stalka

- 1) Za svaki uzorak koji treba testirati izvadite pojedinačne trake s reagensima u bloku iz kompleta BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Lagano udarite svaku traku o čvrstu površinu kako biste osigurali da se sve tekućine nalaze na dnu epruveta i stavite ih na stalke za uzorke sustava BD MAX™ System.
- 2) Izvadite potrebni broj BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes epruveta za ekstrakciju (B4) (bijela folija) iz njihove zaštitne vrećice. Postavite epruvetu/e za ekstrakciju (bijela folija) u njihove odgovarajuće položaje u TNA traku (položaj 1 s oznakom u boji na stalku. Pogledajte Sliku 1). Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnom zatvaračem.
- 3) Odredite i razdvojite odgovarajući broj *Respiratory Virus Mix I* reaction tube (folija 1K) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 2, označen zelenom bojom na stalku. Pogledajte Sliku 1).
 - a. Istisnite višak zraka i zatvorite aluminijske vrećice patentnim zatvaračem.
 - b. U cilju obavljanja pravilnog postupka rehidracije pazite da se liofilizirani proizvod nalazi na dnu epruvete te da ne prijanja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.
- 4) Izvadite odgovarajući broj epruveta Rehydration Buffer tube (folija 11) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 3, nije obojen na stalku. Pogledajte Sliku 1).
 - a. Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnim zatvaračem.
 - b. U cilju osiguravanja pravilnog prijenosa pazite da se tekućina nalazi na dnu epruvete te da ne prijanja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.
- 5) Odredite i razdvojite odgovarajući broj *Respiratory Virus Mix II* reaction tube (folija 1M) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 4, označen plavom bojom na stalku. Pogledajte Sliku 1).
 - a. Istisnite višak zraka i zatvorite aluminijske vrećice patentnim zatvaračem.
 - b. U cilju obavljanja pravilnog postupka rehidracije pazite da se liofilizirani proizvod nalazi na dnu epruvete te da ne prijanja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.

Slika 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (traka s reagensima) (TNA) iz kompleta BD MAX™ ExK ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Postavljanje BD MAX™ instrumenta

- 1) Odaberite karticu „Worklist“ (Radni popis) na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System s verzijom softvera v4.50A ili novijom.
- 2) S padajućeg izbornika „Test“ odaberite željeni test: npr. VIASURE Resp virus (ako test nije već kreiran, pogledajte odjeljak 8.3.1).
- 3) U padajućem izborniku „Kit Lot Number“ (Broj serije kompleta) odaberite odgovarajući broj serije za komplet (nalazi se na vanjskoj kutiji kompleta za ekstrakciju koji se koristi) (neobavezno).
Napomena: Brojevi serija moraju biti definirani u prikazu „Inventory“ (Zalihe) prije nego što se ovdje mogu odabrati.
- 4) Unesite identifikacijski broj epruvete „Sample Buffer Tube“ (Uzorak tampon-cijevi) u polje „Sample tube“ (Epruveta s uzorkom) skeniranjem crtičnog koda pomoću skenera ili ručnim unošenjem broja.
- 5) Ispunite polje „Patient ID“ (ID bolesnika) i/ili „Accession“ (Pristup) i pritisnite tipku „Tab“ (Tabulator) ili „Enter“. Nastavite s postupkom dok ne unesete sve crtične kodove epruveta Sample Buffer Tube. Pazite da se ID uzorka/bolesnika i epruveta Sample Buffer Tube podudaraju.
- 6) Stavite pripremljenu epruvetu za uzorak s puferom na BD MAX™ stalak/stalke.
- 7) Stavite stalak/stalke u sustav BD MAX™ System (stalak A se nalazi na lijevoj strani sustava BD MAX™ System, dok se stalak B nalazi na desnoj strani).
- 8) Stavite potrebni broj patrona BD MAX™ PCR Cartridge(s) u sustav BD MAX™ System.
- 9) Zatvorite vrata sustava BD MAX™ System.
- 10) Kliknite „Start“ (Pokreni) da započnete postupak.

8.3.4. Izvješće o rezultatima BD MAX™

- 1) Na traci izbornika kliknite na gumb „Results“ (Rezultati).
- 2) Kliknite dvaput na svoj postupak na popisu ili pritisnite gumb „view“ (prikaz).
- 3) Gumbi „Print“ (Ispiši) i „Export“ (Izvezi) na dnu zaslona bit će omogućeni.

Da biste ispisali rezultate:

1. Kliknite na gumb „Print“ (Ispiši).
2. U prozoru pretpregleda „Print“ (Ispiši) izvješća o postupku odaberite: „Run Details“ (Podaci o postupku), „Test Details“ (Podaci o testu) i „Plots“ (Grafikon).
3. Kliknite na „Print“ (Ispiši) za ispis izvješća ili kliknite na „Export“ (Izvezi) za izvoz izvješća u PDF-u na USB.

Da biste izvezli rezultate:

1. Kliknite na gumb „Export“ (Izvezi) za prijenos izvješća (PDF i CSV datoteke) na USB.
2. Kada je izvoz dovršen, ikona uspjeha/neuspjeha pojavljuje se u prozoru „Results Export“ (Rezultat izvoza).

9. Tumačenje rezultata

Detaljne upute za analiziranje podataka potražite u Korisničkom priručniku za BD MAX™ System sustav.

Analizu podataka obavlja BD MAX™ softver prema uputama proizvođača. BD MAX™ softver kreira izvješće o Ct vrijednostima i amplifikacijskim krivuljama za svaki kanal detekcije svakog uzorka testiranog na sljedeći način:

- Ct vrijednost 0 znači da softver nije izračunao Ct vrijednost s navedenom granicom (pogledajte Tablicu 5). Amplifikacijska krivulja uzorka koja pokazuje „0“ za Ct vrijednost mora se provjeriti ručno.
- Ct vrijednost od -1 označava da nije došlo do procesa amplifikacije, da softver nije izračunao Ct vrijednost ili da je izračunata Ct vrijednost ispod navedenog praga ili iznad utvrđene Ct Max vrijednosti (granične).
- Svaku drugu Ct vrijednost treba tumačiti u vezi s amplifikacijskom krivuljom i u skladu s definiranom logikom rezultata, prema smjernicama za tumačenje uzoraka navedenim u Tablicama 26 i 27.

Provjerite signal endogene unutarnje kontrole da potvrdite funkcionira li amplifikacijska smjesa ispravno. Pored toga, provjerite da nema izvješća o kvaru sustava BD MAX™ System.

Pomoću sljedećih tablica očitajte i analizirajte rezultate:

Prva glavna smjesa (<i>Respiratory Virus Mix</i> / reaction tube): Snap-in 2				
SARS-CoV-2 (naziv cilja: SARS)	Influenza B (naziv cilja: FLUB)	Influenza A (naziv cilja: FLUA)	Respiratorni sinicijski virus (naziv cilja: RSV)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
POS	POS	POS	POS	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A i RSV
POS	POS	POS	NEG	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza B i Influenza A, a nije detektirana RNA virusa RSV
POS	POS	NEG	POS	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza B i RSV, a nije detektirana RNA virusa Influenza A
POS	NEG	POS	POS	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza A i RSV, a nije detektirana RNA virusa Influenza B
NEG	POS	POS	POS	Detektirana RNA virusa Influenza B, Influenza A i RSV, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2
POS	POS	NEG	NEG	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i Influenza B, a nije detektirana RNA virusa Influenza A i RSV
POS	NEG	POS	NEG	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i Influenza A, a nije detektirana RNA virusa Influenza B i RSV
POS	NEG	NEG	POS	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i RSV, a nije detektirana RNA virusa Influenza B i Influenza A
NEG	POS	POS	NEG	Detektirana RNA virusa Influenza B i Influenza A, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i RSV
NEG	POS	NEG	POS	Detektirana RNA virusa Influenza B i RSV, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i Influenza A
NEG	NEG	POS	POS	Detektirana RNA virusa Influenza A i RSV, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2 i Influenza B
POS	NEG	NEG	NEG	Detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, a nije detektirana RNA virusa Influenza B, Influenza A i RSV
NEG	POS	NEG	NEG	Detektirana RNA virusa Influenza B, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza A i RSV
NEG	NEG	POS	NEG	Detektirana RNA virusa Influenza A, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza B i RSV
NEG	NEG	NEG	POS	Detektirana RNA virusa RSV, a nije detektirana RNA virusa SARS-CoV-2, Influenza B i Influenza A
NEG	NEG	NEG	NEG	Ciljna RNA nije detektirana
UNR	UNR	UNR	UNR	Neriješeni (UNR) rezultat dobiven u prisutnosti inhibitora reakcije PCR-a ili kada dođe do nekog općeg problema (koji nije pokriven šifrom o pogrešci) pri obradi uzorka i/ili amplifikaciji. ¹
IND	IND	IND	IND	Rezultat testa nije moguće utvrditi (IND). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju kvara instrumenta povezanog sa šifrom o pogrešci. ²
INC	INC	INC	INC	Nepotpun rezultat testa (INC). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju neuspješnog obavljanja postupka. ²

Tablica 26. Tumačenje rezultata.

1 Endogena nutarnja kontrola (EIC) mora pokazati amplifikacijski signal s Ct vrijednošću ≤ 35 da bi se uzela u obzir. Ako postoji odsutnost signala za EIC ili Ct vrijednost > 35 , rezultat se smatra Neriješenim (UNR) te je potrebno ponovno testiranje. Provjerite izvješće o rezultatima i Ct vrijednosti odabranih ciljeva te poduzmite odgovarajuće radnje s obzirom na sljedeće:

- I. Kada su rezultati ciljanih gena nevaljani (Ct > 40 , što softver prikazuje kao rezultat „-1“), potrebno je ponoviti test iz primarnog uzorka, pri čemu je potrebno ponovno pripremiti epruvetu s Sample Buffer Tube (SBT), ako je dostupan dovoljan volumen uzorka. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.
- II. Kada su rezultati ciljanih gena valjani (Ct ≤ 40), moguće je da nema amplifikacije ili da je amplifikacija iz EIC s Ct vrijednošću > 35 (što softver prikazuje kao rezultat „-1“) prilikom testiranja visoko koncentriranih uzoraka, zbog preferencijalne amplifikacije specifičnih nukleinskih kiselina cilja. Ako se smatra potrebnim, razrijedite te uzorke u omjeru 1/10, ponovno pripremite epruvetu Sample Buffer Tube (SBT) i ponovite testiranje. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.

NAPOMENA: Nazofaringealni brisevi mogu se čuvati bez prenošenja u SBT do 2 dana ako se čuvaju na temperaturi od 25 °C ili do 7 dana ako se čuvaju na temperaturi od 4 °C.

2 Rezultati Neodređeno (IND) ili Nepotpuno (INC) mogu se dobiti zbog kvara sustava te je potrebno ponovno testiranje. Pogledajte korisnički priručnik sustava BD MAX™ System za tumačenje kodova upozorenja i pogrešaka.

Druga glavna smjesa (<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube): Snap-in 4				
Parainfluenza (naziv cilja: HPIV)	Koronavirus (naziv cilja: HCOV)	Metapneumovirus (naziv cilja: MPV)	Adenovirus (naziv cilja: HADV)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
POS	POS	POS	POS	Detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza, koronavirusa, metapneumovirusa i adenovirusa
POS	POS	POS	NEG	Detektirana RNA virusa parainfluenza, koronavirusa i metapneumovirusa, nije detektirana DNA adenovirusa
POS	POS	NEG	POS	Detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza, koronavirusa i adenovirusa, nije detektirana RNA metapneumovirusa
POS	NEG	POS	POS	Detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza, metapneumovirusa i adenovirusa, nije detektirana RNA koronavirusa
NEG	POS	POS	POS	Detektirana RNA/DNA koronavirusa, metapneumovirusa i adenovirusa, nije detektirana RNA virusa parainfluenza
POS	POS	NEG	NEG	Detektirana RNA virusa parainfluenza i koronavirusa, nije detektirana RNA/DNA metapneumovirusa i adenovirusa
POS	NEG	POS	NEG	Detektirana RNA virusa parainfluenza i metapneumovirusa, nije detektirana RNA/DNA koronavirusa i adenovirusa
POS	NEG	NEG	POS	Detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza i adenovirusa, nije detektirana RNA koronavirusa i metapneumovirusa
NEG	POS	POS	NEG	Detektirana RNA koronavirusa i metapneumovirusa, nije detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza i adenovirusa

Druga glavna smjesa (<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube): Snap-in 4				
Parainfluenza (naziv cilja: HPIV)	Koronavirus (naziv cilja: HCOV)	Metapneumovirus (naziv cilja: MPV)	Adenovirus (naziv cilja: HADV)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
NEG	POS	NEG	POS	Detektirana RNA/DNA koronavirusa i adenovirusa, nije detektirana RNA virusa parainfluenza i metapneumovirusa
NEG	NEG	POS	POS	Detektirana RNA/DNA metapneumovirusa i adenovirusa, nije detektirana RNA virusa parainfluenza i koronavirusa
POS	NEG	NEG	NEG	Detektirana RNA virusa parainfluenza, nije detektirana RNA/DNA koronavirusa, metapneumovirusa i adenovirusa
NEG	POS	NEG	NEG	Detektirana RNA koronavirusa, nije detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza, metapneumovirusa i adenovirusa
NEG	NEG	POS	NEG	Detektirana RNA metapneumovirusa, nije detektirana RNA/DNA virusa parainfluenza, koronavirusa i adenovirusa
NEG	NEG	NEG	POS	Detektirana DNA adenovirusa, nije detektirana RNA virusa parainfluenza, koronavirusa i metapneumovirusa
NEG	NEG	NEG	NEG	Ciljna RNA nije detektirana
UNR	UNR	UNR	UNR	Neriješeni (UNR) rezultat dobiven u prisutnosti inhibitora reakcije PCR-a ili kada dođe do nekog općeg problema (koji nije pokriven šifrom o pogrešci) pri obradi uzorka i/ili amplifikaciji. ¹
IND	IND	IND	IND	Rezultat testa nije moguće utvrditi (IND). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju kvara instrumenta povezanog sa šifrom o pogrešci. ²
INC	INC	INC	INC	Nepotpun rezultat testa (INC). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju neuspješnog obavljanja postupka. ²

Tablica 27. Tumačenje rezultata.

1 Endogena nutarnja kontrola (EIC) mora pokazati amplifikacijski signal s Ct vrijednošću ≤ 35 da bi se uzela u obzir. Ako postoji odsutnost signala za EIC ili Ct vrijednost > 35 , rezultat se smatra Neriješenim (UNR) te je potrebno ponovno testiranje. Provjerite izvješće o rezultatima i Ct vrijednosti odabranih ciljeva te poduzmite odgovarajuće radnje s obzirom na sljedeće:

- I. Kada su rezultati ciljanih gena nevaljani ($Ct > 40$, što softver prikazuje kao rezultat „-1“), potrebno je ponoviti test iz primarnog uzorka, pri čemu je potrebno ponovno pripremiti epruvetu s Sample Buffer Tube (SBT), ako je dostupan dovoljan volumen uzorka. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.
- II. Kada su rezultati ciljanih gena valjani ($Ct \leq 40$), moguće je da nema amplifikacije ili da je amplifikacija iz EIC s Ct vrijednošću > 35 (što softver prikazuje kao rezultat „-1“) prilikom testiranja visoko koncentriranih uzoraka, zbog preferencijalne amplifikacije specifičnih nukleinskih kiselina cilja. Ako se smatra potrebnim, razrijedite te uzorke u omjeru 1/10, ponovno pripremite epruvetu Sample Buffer Tube (SBT) i ponovite testiranje. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.

NAPOMENA: Nazofaringealni brisevi mogu se čuvati bez prenošenja u SBT do 2 dana ako se čuvaju na temperaturi od 25 °C ili do 7 dana ako se čuvaju na temperaturi od 4 °C.

2 Rezultati Neodređeno (IND) ili Nepotpuno (INC) mogu se dobiti zbog kvara sustava te je potrebno ponovno testiranje. Pogledajte korisnički priručnik sustava BD MAX™ System za tumačenje kodova upozorenja i pogrešaka.

Napomena: Kada koristite vanjske kontrole, one bi trebale dati sljedeće očekivane rezultate: negativne za ENC i pozitivne za EPC (očekuje se da će poznati pozitivni uzorci biti pozitivni samo za mikroorganizme prisutne u uzorku). ENC koji daje pozitivne rezultate testa ukazuje na događaj kontaminacije ili pogrešku u rukovanju uzorkom. EPC koji daje negativne rezultate ukazuje na problem u rukovanju/pripremi uzorka. Pregledajte tehniku rukovanja/pripreme uzoraka. Kada dođe do pogreške vanjske kontrole, potrebno je ponovno testiranje.

U slučaju stalnog dvosmislenog rezultata preporučuje se pregledati upute za uporabu te proces ekstrakcije koji koristi korisnik; za potvrdu ispravne učinkovitosti svakog PCR koraka te pregled parametara; te za provjeru sigmoidnog oblika krivulje i intenzitet fluorescencije.

Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.

10. Ograničenja testa

- Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.
- Iako se ovaj test može koristiti s drugim vrstama uzoraka, validiran je samo s nazofaringealnim brisevima.
- Za dobru učinkovitost testa liofilizirani proizvod mora biti na dnu epruvete te ne smije prijanjati na gornjem dijelu epruvete ili čepa od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.
- Kvaliteta testa ovisi o kvaliteti uzorka; nukleinska kiselina mora biti pravilno ekstrahirana iz kliničkih uzoraka.
- Ovaj test je samo kvalitativne test te ne osigurava kvantitativni vrijednosti te ne ukazuje na broj prisutnih organizama. Nije moguće povezati Ct vrijednosti dobivene PCR-om s koncentracijom uzorka jer one ovise o korištenom termocikleru i samom ciklusu.
- Izuzetno niske razine ciljnih elemenata ispod razine detekcije mogu biti detektirane, no moguće je da se rezultati neće moći ponoviti.
- Imajte na umu planirani raspon mjerenja testa jer uzorci s koncentracijama iznad ili ispod tog raspona mogu dati pogrešne rezultate.
- Postoji mogućnost pojave lažnih pozitivnih rezultata zbog unakrsne kontaminacije virusima SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E,

NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i adenovirus koji sadrže visoke koncentracije ciljane RNA/DNA ili kontaminacije zbog proizvoda PCR-a iz prethodnih reakcija.

- Kombinacije specifičnih početnica i sonda za detekciju gena *N* i *ORF1ab* virusa SARS-CoV-2, gena *M* (matrični protein (M1)) za virus Influenza A/B, gena *HA* za virus Influenza A podtip H1N1, gena *N* virusa RSV (tipovi A i B), gena *HN* virusa parainfluenca (tipovi 1, 2 i 3), gena *F* virusa parainfluenca (tip 4), gena *N* koronavirusa (229E, NL63, HKU1 i OC43), gena *F* metapneumovirusa i gena *hexon* adenovirusa, korištene u VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, ne pokazuju značajne kombinirane homologije s ljudskim genomom, ljudskom mikroflorom ili drugim respiratornim mikroorganizmima, što bi moglo rezultirati predvidljivim lažno pozitivnim rezultatima.
- Lažno negativni rezultati mogu nastati uslijed nekoliko čimbenika te njihovih kombinacija uključujući:
 - nepravilno prikupljanje uzoraka, transport, pohrana i/ili metode rukovanja.
 - Nepravilne postupke obrade (uključujući ekstrakciju RNA/DNA).
 - Degradacija virusne RNA/DNA tijekom otpreme/pohrane i/ili obrade uzorka.
 - Mutacije ili polimorfizmi u regijama vezanja početnice ili sonde mogu utjecati na detekciju novih ili nepoznatih sojeva virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenca (tipovi 1, 2, 3 i 4), humani koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i/ili adenovirus.
 - Virusno opterećenje u uzorku koje je ispod granice detekcije za test.
 - Prisutnost RT-qPCR inhibitora ili drugih tipova interferirajućih tvari. Nije procijenjen utjecaj cjepiva, nekih antivirusnih terapija, antibiotika, kemoterapijskih sredstva, imunosupresiva ili antimikotika korištenih za prevenciju infekcija ili tijekom liječenja infekcije.
 - Učinak interferirajućih tvari procijenjen je samo za one navedene u odjeljku 12.7.1 (studija o interferirajućim tvarima) ove upute za uporabu. Interferencija je uočena prilikom testiranja flutikazona (1,26E-06 mg/ml) i nikotina (3,00E-02 mg/ml) kako u *Respiratory Virus Mix I* reaction tube tako i u *Respiratory Virus Mix II* reaction tube. U ovom odjeljku možete provjeriti najčešće endogene i egzogene tvari koje izazivaju potpuno ili djelomično ometanje reakcije RT-qPCR. Druge tvari koje nisu navedene u ovom dijelu mogu dovesti do pogrešnih rezultata.
 - Neuspjeh u pridržavanju uputa za uporabu te prilikom postupka testiranja.
- Pozitivan rezultat testa ne ukazuje nužno na prisutnost vidljivih virusa te ne ukazuje da su ti virusi infektivni ili uzročni agensi za kliničke simptome. Međutim, pozitivan rezultat ukazuje na prisutnost ciljnih virusnih sekvenci.
- Negativni rezultati ne isključuju prisutnost RNA/DNA virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenca (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i/ili adenovirus u kliničkom uzorku i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za liječenje ili druge odluke o zbrinjavanju bolesnika. Nisu određene optimalne vrste uzoraka i izračun vremena vršnih razina virusa tijekom infekcija čiji su uzrok navedeni mikroorganizmi. Za detekciju patogena može biti potrebno prikupljanje više uzoraka (vrste i vremenske točke) od istog bolesnika.

- Moguće je da bi detekcija nekih cirkulirajućih sojeva iz 2019. koji pripadaju liniji Victoria virusa Influenza B mogla biti ugrožena zbog točkastih mutacija u tim novim sojevima. Testirana je samo inkluzivnost virusa Influenza B za varijante koje sadrže mutacije C54T, C55T i C120T (referentna sekvenca NC002210.1).
- Ako su dijagnostički testovi na ostale respiratorne bolesti negativni, a klinička opažanja, anamneza bolesnika te epidemiološke informacije sugeriraju da je moguća infekcija virusom SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i/ili adenovirus, potrebno je razmotriti mogućnost lažnog negativnog rezultata i ponovnog testiranja bolesnika.
- Vrijednosti fluorescencije mogu varirati zbog višestrukih čimbenika kao što su: oprema za PCR (čak i ako je isti model), sustav ekstrakcije, vrsta uzorka, prethodna obrada uzorka itd... između ostalog.
- Uređaj uključuje početnice i sonde koje specifično detektiraju soj Influenza A H1N1pdm09. Pandemijski soj gripe ne može se isključiti i treba razmotriti dodatna testiranja u slučaju pozitivnog rezultata na gripu.
- Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti vrlo su ovisne o prevalenciji u svim testovima za *in vitro* dijagnostiku. Učinkovitost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System može varirati ovisno o prevalenciji i populaciji koja se testira.
- U slučaju neriješenih, neutvrdivih ili nepotpunih rezultata primjenom kompleta za detekciju VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, potrebno je ponovno testiranje. Neriješeni rezultati mogu biti posljedica prisutnosti inhibitora u uzorku ili nepravilne rehidracije epruvete s liofiliziranom reakcijskom smjesom. Ako postoji kvar na instrumentu, dobivaju se neutvrdivi ili nepotpuni rezultati.

11. Kontrola kvalitete

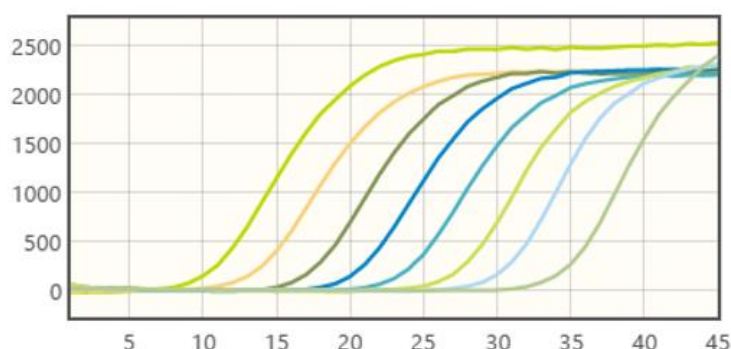
Komplet VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sadrži endogenu unutarnju kontrolu (EIC) u svakoj reakcijskoj epruveti pomoću koje se potvrđuje pravilno provođenje tehnike. Osim toga, korištenje vanjskih kontrola (EPC i ENC) omogućuje potvrdu učinkovitosti testa. Sustav BD MAX™ System ne koristi vanjske kontrole u svrhu tumačenja rezultata, već ih smatra uzorkom. Vanjska pozitivna kontrola (EPC) namijenjena je praćenju moguće neispravnosti reagensa testa, dok je vanjska negativna kontrola (ENC) namijenjena detekciji kontaminacije okoline ili reagensa ciljnim nukleinskim kiselinama.

12. Značajke analitičke učinkovitosti

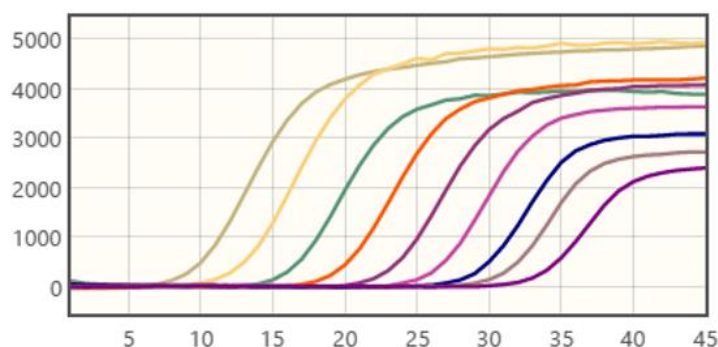
12.1. Analitička linearnost

Linearnost testa određena je i potvrđena testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja uzoraka nazofaringealnog brisa koji sadrže poznatu koncentraciju specifične i sintetske RNA/DNA virusa SARS-CoV-2, virusa Influenza A, virusa Influenza B, humanog respiratornog sincicijskog virusa, virusa parainfluenca, koronavirusa, metapneumovirusa i adenovirusa (u rasponu od $2E+07$ do $2E+00$ kopija po μL). U nastavku je naveden primjer amplifikacijskih dijagrama koji su rezultat testa:

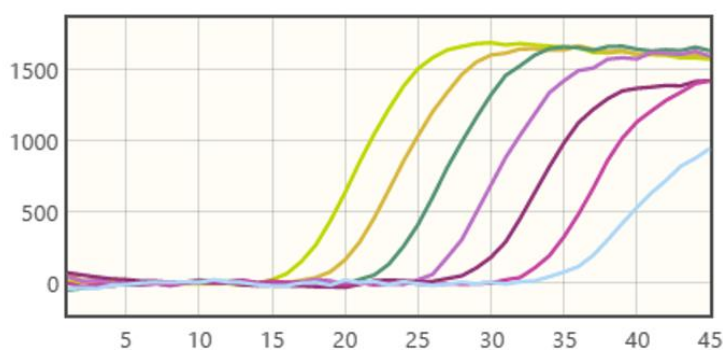
Slika 2. Serija razrjeđivanja predloška virusa SARS-CoV-2 (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μL) analizirana na sustavu BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



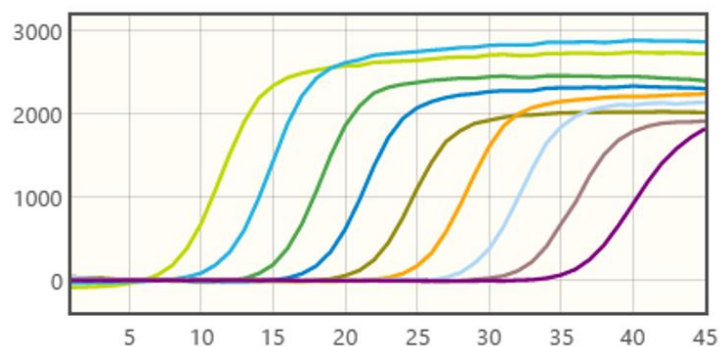
Slika 3. Serija razrjeđivanja predloška virusa Influenza B (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μL) analizirana na sustavu BD MAX™ System (530/565 (HEX) kanal).



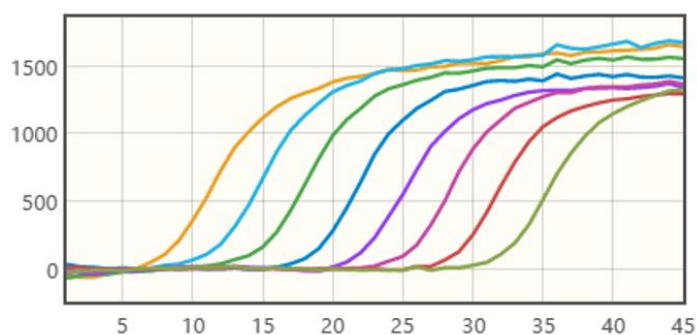
Slika 4. Serija razrjeđivanja predloška virusa Influenza A (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μL) analizirana na sustavu BD MAX™ System (585/630 (ROX) kanal).



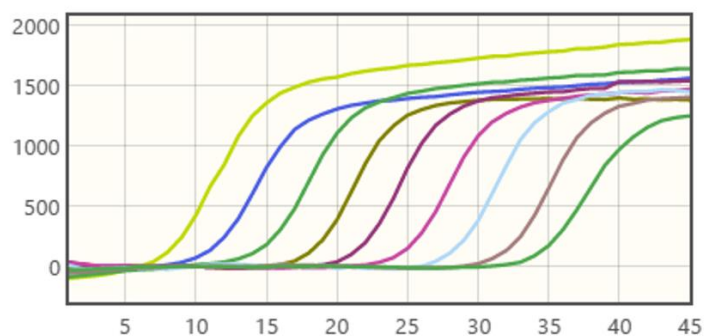
Slika 5. Serija razrjeđivanja predložka virusa RSV (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ l) analizirana na sustavu BD MAX™ System (630/665 (Cy5) kanal).



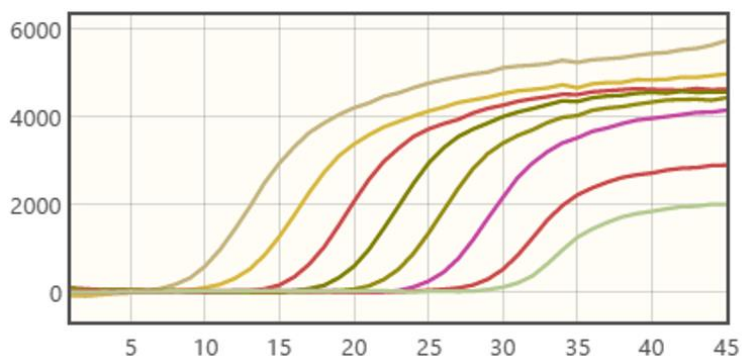
Slika 6. Serija razrjeđivanja predložka virusa prainfluence (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ l) analizirana na sustavu BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



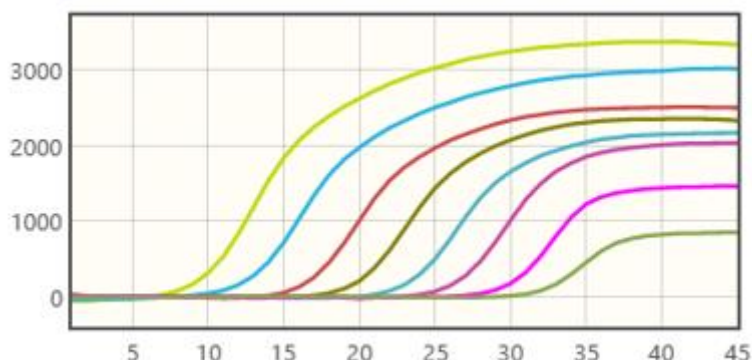
Slika 7. Serija razrjeđivanja predložka koronavirusa (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ l) analizirana na sustavu BD MAX™ System (530/565 (HEX) kanal).



Slika 8. Serija razrjeđivanja predložka metapneumovirusa (od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ l) analizirana na sustavu BD MAX™ System (585/630 (ROX) kanal).



Slika 9. Serija razrjeđivanja predložka adenovirusa (od 2E+07 do 2E+00 kopija/μl) analizirana na sustavu BD MAX™ System (630/665 (Cy5) kanal).



12.2. Analitička osjetljivost. Granica osjetljivosti testa (LoD)

Analitička osjetljivost ili granica detekcije (LoD) za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System analizirana je s tri serije korištenjem negativnih nazofaringealnih briseva prikupljenih u sustavu BD™ Universal Viral Transport System s dodatkom referentnih sojeva ili sintetske RNA navedene u sljedećoj tablici:

Virus	Soj/sintetska RNA	Vanjska referenca
SARS-CoV-2	Heat-inactivated SARS-CoV-2 soj 2019-n-CoV/USA-WA1/2020	VR-1986HK
Influenza A	Virus Influenza A (H1N1) soj A/PR/8/34	VR-95PQ
Influenza B	Virus Influenza B (linija Yamagata) soj B/Florida/4/2006	VR-1804PQ
RSV A	Ljudski respiratorni sincicijski virus A soj Long	VR-26PQ
RSV B	Ljudski respiratorni sincicijski virus soj 9320	FR-293
Virus parainfluenca tip 1	Ljudski virus parainfluenca 1 soj C35	VR-94
Virus parainfluenca tip 2	Ljudski virus parainfluenca 2 soj Greer	VR-92
Virus parainfluenca tip 3	Ljudski virus parainfluenca 3 soj C 243	VR-93
Virus parainfluenca tip 4	Ljudski virus parainfluenca 4b soj CH 19503	VR-1377
Koronavirus OC43	Betakoronavirus 1	VR-1558
Koronavirus 229E	Ljudski koronavirus 229E	VR-740
Koronavirus NL63	Ljudski koronavirus soj NL63	FR-304
Koronavirus HKU1	Kvantitativna sintetska RNA humanog koronavirusa HKU1	ATCC-VR3262SD
Metapneumovirus	Tekući medij kulture humanog metapneumovirusa 8 (hMPV-8) tip B2 (toplinski inaktiviran)	0810159CF
Adenovirus	Ljudski adenovirus 1 soj Adenoid 71	VR-1

Tablica 28. Referentni sojevi i sintetska RNA korišteni za testove učinkovitosti kompleta VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (test granice detekcije – LoD).

Osim toga, u slučaju cilja SARS-CoV-2, analiziran je LoD (IU/μL) korištenjem 1st WHO International Standard SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code 20/146). Rezultati LoD-a dobiveni kompletom VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detaljno su opisani u sljedećoj tablici:

Nazofaringealni bris			
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube			
SARS	FLUA	FLUB	RSV
4,5E+00 IU/μL	6,7E-01 kopija/μL	7,29E+00 kopija/μL	1,35E+00 kopija/μL RSV A 2,52E+01 TCID50/ml RSV B
<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube			
HPIV	HCOV	MPV	HADV
5,33E+00 TCID50/ml HPIV 1 4,80E+00 TCID50/ml HPIV 2 9,00E+02 TCID50/ml HPIV 3 1,44E+01 TCID50/ml HPIV 4	4,80E-02 TCID50/ml HCOV OC43 1,60E-01 TCID50/ml HCOV 229E 4,80E-03 TCID50/ml HCOV NL63 6,00E+00 kopija/μL HCOV HKU1	5,10E-02 TCID50/ml	6,00E+00 TCID50/ml

Tablica 29. Rezultati granice detekcije za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. IU = međunarodna jedinica, TCID50 = Median Tissue Culture Infection Dose (medijan infektivne doze za staničnu kulturu).

12.3. Mjerni raspon

Mjerni raspon testa određivan je testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja koja sadrže poznatu koncentraciju specifične i sintetske RNA/DNA iz virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i adenovirus. Rezultati su omogućili potvrdu ispravne detekcije ciljeva od 2E+07 do 2E+00 kopija/μL, osim za HCoV-HKU1 čiji raspon mjerenja ide od 2E+06 do 2E+00 kopija/μL.

Zaključno, mjerni raspon za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System uspješno je određen, čime se osiguravaju pouzdani, točni i reproducibilni rezultati u širokom spektru virusnih opterećenja, potvrđujući njegovu korisnost u različitim kliničkim dijagnostičkim scenarijima.

12.4. Točnost

12.4.1. Istinitost (Vjerodostojnost)

Vjerodostojnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System procijenjena je testiranjem referentnog materijala navedenog u nastavku s dodatkom negativnim nazofaringealnim brisevima prikupljenim u sustavu BD™ Universal Viral Transport System.

1. Sintetski fragmenti DNA

- Sintetski fragment DNA za gen *ORF1* virusa SARS-CoV-2: NCOXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa SARS-CoV-2: NCOXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *M1* virusa Influenza A: YIAXPC, ROX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *HA* virusa Influenza A: HNVXPC, ROX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *M1* virusa Influenza B: YIBXPC, HEX kanal.

- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa RSV A: RSAXPC, Cy5 kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa RSV B: RSBXPC, Cy5 kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *HN* virusa parainfluenca 1: PIXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *HN* virusa parainfluenca 2: PIXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *HN* virusa parainfluenca 3: PIXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *F* virusa parainfluenca 4: PIXPC, FAM kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa koronavirus OC43: CORXPC, HEX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa koronavirus-229E: CORXPC, HEX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* virusa koronavirus-NL63: CORXPC, HEX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *N* koronavirusa HKU1: CORXPC, HEX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *F* metapneumovirusa: MPVXPC, ROX kanal.
- Sintetski fragment DNA za gen *hexon* adenovirusa: ADVXPC, Cy5 kanal.

Svi sintetski fragmenti DNA detektirani su ispravno u odgovarajućem kanalu.

2. American Type Culture Collection („ATCC®“)

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
VR-1986HK	SARS-CoV-2	Heat-inactivated SARS-CoV-2	2019-nCoV/USA-WA1/2020	Detektiran
VR-3276SD	SARS-CoV-2	Quantitative Synthetic SARS-CoV-2 RNA: ORF, E, N	N/A	Detektiran
VR-1986D	SARS-CoV-2	Genomic RNA from 2019 Novel Coronavirus	SARS-Related Coronavirus 2, izolat USA-WA1/2020	Detektiran
VR-95PQ	Influenza A	Influenza A virus (H1N1), Purified	A/PR/8/34	Detektiran
VR-1804PQ	Influenza B	Influenza B virus (Yamagata Lineage), Purified	B/Florida/4/2006	Detektiran
VR-26PQ	RSV-A	Human respiratory syncytial virus, High titer	Soj Long	Detektiran
VR-94	Virus Parainfluenca 1	Human parainfluenza virus 1 (HPIV-1)	Soj C35	Detektiran
VR-92	Virus Parainfluenca 2	Human parainfluenza virus 2 (HPIV-2)	Soj Greer	Detektiran
VR-93	Virus Parainfluenca 3	Human parainfluenza virus 3 (HPIV-3)	Soj C 243	Detektiran
VR-1377	Virus Parainfluenca 4	Human parainfluenza virus 4 (HPIV-4b)	Soj CH 19503	Detektiran
VR-1558	Koronavirus OC43	Betacoronavirus 1	Soj OC43	Detektiran

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
VR-740	Koronavirus 229E	Human coronavirus 229E	Soj 229E	Detektiran
VR-3262SD	Koronavirus HKU1	Quantitative Synthetic Human Coronavirus Strain HKU1 RNA	Soj HKU1	Detektiran
VR-3262SD	Koronavirus NL63	Quantitative Synthetic Human coronavirus Strain NL63 RNA	Soj NL63	Detektiran
VR-3250SD	Metapneumovirus	Synthetic Human metapneumovirus RNA	N/A	Detektiran
VR-1	Adenovirus	Human adenovirus 1	Soj Adenoid 71	Detektiran
VR-6	Adenovirus	Human Adenovirus 6	Tip 6 (vrsta C) soj Tonsil 99	Detektiran
VR-16	Adenovirus	Human Adenovirus 15	Tip 15 (vrsta D) soj 305 [955, CH. 38]	Detektiran
VR-3343	Adenovirus	Human adenovirus 31	Tip 31 (vrsta A) soj 1315/63	Detektiran

Tablica 30. Referentni materijal iz Američke zbirke tipova kultura (ATCC®).

Svi sojevi iz ATCC-a ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 35 .

3. International Reagent Resource (IRR™)

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
FR-293	RSV-B	Human Respiratory Syncytial Virus B	Soj 9320	Detektiran
FR-304	Koronavirus NL63	Human Coronavirus, soj NL63	Soj NL63	Detektiran
FR-1	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	Detektiran
FR-3	Influenza A	Influenza A virus	A/South Dakota/6/2007 (H1N1)	Detektiran
FR-5	Influenza A	Influenza A virus	A/Hawaii/31/2007 (H1N1)	Detektiran
FR-6	Influenza A	Influenza A virus	A/Qatar/1123/2007 (H1N1)	Detektiran
FR-7	Influenza A	Influenza A virus	A/Cambodia/0371/2007 (H1N1)	Detektiran
FR-8	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	Detektiran
FR-12	Influenza A	Influenza A virus	A/Taiwan/760/2007 (H3N2)	Detektiran

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
FR-13	Influenza A	Influenza A virus	A/Texas/71/2007 (H3N2)	Detektiran
FR-27	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2)	Detektiran
FR-28	Influenza A	Influenza A virus	A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1)	Detektiran
FR-29	Influenza A	Influenza A virus	A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1)	Detektiran
FR-201	Influenza A	Influenza A virus	A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	Detektiran
FR-202	Influenza A	Influenza A virus	A/California/08/2009 (H1N1)pdm09	Detektiran
FR-203	Influenza A	Influenza A virus	A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus	Detektiran
FR-245	Influenza A	Influenza A virus	A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09	Detektiran
FR-246	Influenza A	Influenza A virus	A/California/07/2009 NYMC X-179A (H1N1)pdm09	Detektiran
FR-16	Influenza B	Influenza B virus	B/Pennsylvania/7/2007 (linija Yamagata)	Detektiran
FR-17	Influenza B	Influenza B virus	B/Santiago/4364/2007 (linija Yamagata)	Detektiran
FR-18	Influenza B	Influenza B virus	B/Brisbane/3/2007 (linija Yamagata)	Detektiran
FR-19	Influenza B	Influenza B virus	B/Pennsylvania/5/2007 (linija Victoria)	Detektiran
FR-20	Influenza B	Influenza B virus	B/Victoria/304/2006 (linija Victoria)	Detektiran
FR-183	Influenza B	Influenza B virus	B/Bangladesh/3333/2007 (linija Yamagata)	Detektiran
FR-294	RSV A	Human Respiratory Syncytial Virus	Soj A-2	Detektiran

Tablica 31. Referentni materijal iz International Reagent Resource (IRR™).

Svi sojevi iz IRR-a ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 35 .

4. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
20/146	SARS-CoV-2	First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA	Izolat England/02/2020	Detektiran
20/110	SARS-CoV-2	2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) Working Reagent for NAT	N/A	Detektiran

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
19/304	SARS-CoV-2	Research Reagent for SARS-CoV-2 RNA	N/A	Detektiran
08/176	Virus Parainfluenza 1	Parainfluenza Virus Serotype 1	N/A	Detektiran
08/178	Virus Parainfluenza 2	Parainfluenza Virus Serotype 2	N/A	Detektiran
08/180	Virus Parainfluenza 4	Parainfluenza Virus Serotype 1	N/A	Detektiran
08/320	Metapneumovirus	Human Metapneumovirus Working Reagent for NAT	N/A	Detektiran
16/324	Adenovirus	First WHO International Standard for Human Adenovirus DNA	Tip 2	Detektiran

Tablica 32. Referentni materijal National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Svi sojevi iz NIBSC-a ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 35 .

5. BEI Resources

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
NR-52287	SARS-CoV-2	SARS-Related Coronavirus 2	Izolat USA-WA1/2020, ozračen gama-zrakama	Detektiran
NR-28530	RSV	Human Respiratory Syncytial Virus, A2000/3-4	Soj A2000/3-4	Detektiran
NR-22227	Metapneumovirus	Human metapneumovirus	TN/83-1211	Detektiran

Tablica 33. Referentni materijal iz BEI Resources.

Svi sojevi iz BEI Resources ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 35 .

6. Kontrolni materijal

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
Fluarix Tetra 2022/2023	Influenza A/ Influenza B	Influenza vaccine Fluarix Tetra 2022/2023	Flu A/Victoria/2570/2019 Flu A/Darwin/6/2021 Flu B/Austria/1359417/2021 Flu B/Phuket/3073/2013	Detektiran
Fluarix Tetra 2023/2024	Influenza A/ Influenza B	Influenza vaccine Fluarix Tetra 2023/2024	Flu A/Victoria/4897/2022 Flu A/Darwin/6/2021 Flu B/Austria/1359417/2021 Flu B/Phuket/3073/2013	Detektiran
102019	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1	SARS-CoV-2 izolat Australia/VIC01/2020	Detektiran
102024	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2	SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1	Detektiran

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
103907	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14	UK varijanta (B.1.1.7_710528)	Detektiran
103909	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15	UK varijanta (B.1.1.7_601443)	Detektiran
104043	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16	Južnoafrička varijanta	Detektiran
104044	SARS-CoV-2	Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17	Japanska/Brazilska varijanta	Detektiran
0505-0129	SARS-CoV-2	Accuplex™ SARS-CoV-2 Verification Panel	N/A	Detektiran
MBC139-R	SARS-CoV-2	AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 RNA CONTROL	Linija B.1.351	Detektiran
MBTC030-R	SARS-CoV-2	AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL	Linija B.1.351	Detektiran
MBTC031-R	SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B i RSV	AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2/FLUA/FLUB/RSV CONTROL	Influenza A H3N2 (A/Perth/16/2009), Influenza B (B/Brisbane/60/2008), RSV (9320)	Detektiran
MBC144-R	MPV	AMPLIRUN® METAPNEUMOVIRUS RNA CONTROL	Linija B1	Detektiran
SCV2_24C1B-01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Delta variant	Delta varijanta B.1.617.2	Detektiran
SCV2_23C1D-01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija XBB	Detektiran
SCV2_23C1D-02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BQ1.1	Detektiran
SCV2_23C1D-03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.2.75	Detektiran
SCV2_23C1D-04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.5	Detektiran
SCV2_23C1D-05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BQ1.1	Detektiran
SCV2_23C1B-01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.4	Detektiran
SCV2_23C1B-03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.5	Detektiran
SCV2_23C1B-04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.4	Detektiran
SCV2_23C1B-05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.2	Detektiran
SCV2_23C1C-01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.2.75	Detektiran
SCV2_23C1C-02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BQ1.1	Detektiran
SCV2_23C1C-03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BQ1.1	Detektiran

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
SCV2_23C1C-04	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija XBB	Detektiran
SCV2_23C1C-05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.2	Detektiran
SCV2_23C1A-01	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.5	Detektiran
SCV2_23C1A-02	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.2	Detektiran
SCV2_23C1A-03	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.5	Detektiran
SCV2_23C1A-05	SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 Omicron variant	Podlinija BA.4	Detektiran
ID3-09 2023	RSV	Influenza A virus	Soj A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)	Detektiran
359043	RSV	Human Respiratory Syncytial Virus, B	N/A	Detektiran
PINFRNA101S-06	Virus Parainfluenza tip 2	PIV-2	N/A	Detektiran
PINFRNA22S-02	Virus Parainfluenza tip 3	PIV-3	N/A	Detektiran
CVRNA22S-04	Koronavirus	Coronavirus HKU	Soj HKU	Detektiran
0810110CF	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 2	Tip 2 (vrsta C)	Detektiran
0810062CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 3	Tip 3 (vrsta B)	Detektiran
0810070CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 4	Tip 4 (vrsta E)	Detektiran
0810020CF	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 5	Tip 5 (vrsta C)	Detektiran
0810021CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 7A	Tip 7A (vrsta B)	Detektiran
0810119CFHI	Adenovirus	Adenovirus Culture Fluid (Heat Inactivated) Type 37	Tip 37	Detektiran
0810084CFHI	Adenovirus	Adenovirus Type 40 Culture Fluid (Heat Inactivated) Strain Dugan	Tip 40, soj Dugan	Detektiran
0810085CFHI	Adenovirus	Adenovirus Type 41 Culture Fluid (Heat Inactivated) Strain Tak	Tip 41 (vrsta F), soj Tak	Detektiran
0810159CF	MPV	Human Metapneumovirus 8	Tip B2	Detektiran

Tablica 34. Kontrolni materijal za viruse SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV, parainfluenza, koronavirus, metapneumovirus i adenovirus.

Svi sojevi ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC pokazao je amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 35.

7. Programi vanjske procjene kvalitete (EQA)

Ukupno 85 uzoraka koji su sadržavali viruse SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV, parainfluenza, koronavirus, metapneumovirus i/ili adenovirus, među ostalim neciljanim mikroorganizmima, analizirano je iz programa QCMD, INSTAND, CAP i RCPA, pokazujući visoku podudarnost.

12.4.2. Preciznost

Kako bi se odredila preciznost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, provedeni su testovi intra-test (ponovljivost), inter-test, inter-serija i inter-oprema (reproducibilnost) s nazofaringealnim brisom prikupljenim sustavom BD™ Universal Viral Transport System s dodatkom referentnih sojeva koji su navedeni u tablici 28 za reprezentativne ciljeve odabrane za svaki kanal fluorescencije: SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, virus parainfluenza tip 3, koronavirus OC43, metapneumovirus i adenovirus.

Intra-test

Intra-test proveden je analizom šest replikata svih uzoraka u istom ciklusu korištenjem VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjim tablicama.

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,30	0,31	1,02
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,15	0,45	1,53
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,98	0,53	1,62
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,32	0,52	1,68
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	33,45	1,35	4,03
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,37	0,67	2,15
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,18	1,49	4,64
	5xLoD	630/665 (CY5)	31,02	0,56	1,79
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	26,17	0,38	1,46
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,97	0,50	1,93
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	26,37	0,91	3,46

Tablica 35. Rezultati intra-test za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga, ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

<i>Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus Parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	32,13	0,56	1,76
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,97	1,16	3,88
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Koronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	34,23	0,73	2,14
	5xLoD	530/565 (HEX)	32,03	0,85	2,65
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,53	0,66	2,09
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,63	0,77	2,61
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	34,35	0,10	0,31
	5xLoD	630/665 (CY5)	33,55	1,39	4,15
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,72	0,53	2,08
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,57	0,61	2,39
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,63	0,23	0,91

Tablica 36. Rezultati intra-test za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Intertestno

Intertestno je testirano testiranjem četiri replikata različitih uzoraka u tri različita dana od strane tri različita operatera, korištenjem VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjim tablicama.

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,33	0,38	1,27
	5xLoD	475/520 (FAM)	28,93	0,28	0,97
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,61	0,66	2,03
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,55	0,46	1,45
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	32,94	0,99	2,99
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,95	0,76	2,37
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,80	0,74	2,27
	5xLoD	630/665 (CY5)	31,67	0,53	1,68
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,90	0,25	0,95
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,99	0,40	1,55
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,84	0,31	1,21

Tablica 37. Rezultati inter-test za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

<i>Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus Parainfluenca	2xLoD	475/520 (FAM)	31,86	0,71	2,22
	5xLoD	475/520 (FAM)	30,18	0,82	2,72
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Koronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	33,45	0,76	2,27
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,56	0,96	3,04
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	30,79	0,93	3,01
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,68	0,88	2,97
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	35,08	1,62	4,61
	5xLoD	630/665 (CY5)	33,20	0,77	2,33
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,49	0,31	1,21
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,65	0,33	1,30
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,52	0,31	1,21

Tablica 38. Rezultati inter-test za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Inter-serija

Vrijednosti inter-serija određene su sa šest replikata različitih uzoraka korištenjem tri serije VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjim tablicama.

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	29,07	0,45	1,53
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,14	0,59	2,01
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A

<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,58	0,64	1,95
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,01	1,03	3,31
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	32,75	1,7	5,33
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,61	1,14	3,62
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	31,72	1,90	5,99
	5xLoD	630/665 (CY5)	30,21	1,35	4,46
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,40	0,31	1,23
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,61	0,53	2,06
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,54	0,37	1,45

Tablica 39. Inter-serijski rezultati za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus Parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	31,45	1,20	3,82
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,53	0,59	1,99
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Koronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	32,35	0,71	2,20
	5xLoD	530/565 (HEX)	30,18	1,33	4,39
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,66	1,00	3,16
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,16	1,25	4,29
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	33,23	0,70	2,12
	5xLoD	630/665 (CY5)	32,83	1,06	3,23
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	24,82	0,43	1,73
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,57	0,42	1,64
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,03	0,36	1,43

Tablica 40. Inter-serijski rezultati za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Inter-oprema

Vrijednosti inter-oprema određene su sa šest replikata istih uzoraka korištenih za intratestne, intertestne i inter-serijske vrijednosti, korištenjem VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Navedeni testovi provedeni su na dva laboratorijska mjesta s dva različita sustava BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjim tablicama.

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
SARS-CoV-2	2xLoD	475/520 (FAM)	30,30	0,29	0,96
	5xLoD	475/520 (FAM)	28,93	0,24	0,82
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Influenza B	2xLoD	530/565 (HEX)	32,70	0,42	1,29
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,26	0,45	1,43
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Influenza A	2xLoD	585/630 (ROX)	33,33	1,47	4,42
	5xLoD	585/630 (ROX)	31,52	0,61	1,92
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A
RSV	2xLoD	630/665 (CY5)	32,80	0,76	2,33
	5xLoD	630/665 (CY5)	30,88	1,30	4,20
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	35,97	0,32	1,24
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,71	0,33	1,28
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,96	0,37	1,44

Tablica 41. Rezultati inter-oprema za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

<i>Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Virus Parainfluenza	2xLoD	475/520 (FAM)	31,95	0,83	2,61
	5xLoD	475/520 (FAM)	29,79	0,95	3,18
	Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	N/A	N/A
Koronavirus	2xLoD	530/565 (HEX)	34,26	0,74	2,15
	5xLoD	530/565 (HEX)	31,95	0,61	1,91
	Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	N/A	N/A
Metapneumovirus	2xLoD	585/630 (ROX)	31,59	0,50	1,58
	5xLoD	585/630 (ROX)	29,51	1,03	3,48
	Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	N/A	N/A

<i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube					
Cilj	Uzorci	Kanal	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
Adenovirus	2xLoD	630/665 (CY5)	34,14	0,72	2,12
	5xLoD	630/665 (CY5)	32,31	0,36	1,13
	Negativna kontrola	630/665 (CY5)	Neg	N/A	N/A
EIC	2xLoD	680/715 (CY5.5)	25,35	0,22	0,85
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	25,10	0,22	0,87
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	25,73	0,28	1,11

Tablica 42. Rezultati inter-oprema za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga, ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Zaključno, studija preciznosti potvrdila je pouzdanu učinkovitost i dosljednost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.5. Prijenos

Robusnost (parametar prijenosa) analizirana je prema zajedničkim specifikacijama za određenu klasu D IVD uređaja u skladu s Uredbom (EU) 2017/746; posebno prema Prilogu XIII. koji utvrđuje zajedničke specifikacije za uređaje namijenjene detekciji ili kvantifikaciji markera infekcije virusom SARS-CoV-2. Te preporuke odnosile su se samo na ciljni virus SARS-CoV-2, ostale ciljeve reakcijske epruvete *Respiratory Virus Mix I* reaction tube nisu analizirane u tom testu. Međutim, virus parainfluenza tip 3 također je analiziran kao cilj reakcijske epruvete *Respiratory Virus Mix II* reaction tube kako bi se test obavio s obje glavne smjese.

Stope kontaminacije prijenosom određene su testiranjem 60 replikata negativnih uzoraka nazofaringealnih briseva i 60 replikata uzorka pozitivnog na RNA virusa SARS-CoV-2 s visokim titrom RNA virusa SARS-CoV-2 (First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146), pri 1E+02 IU/ml) i uzorka RNA humanog virusa parainfluenza tipa 3 pozitivnog s visokim titrom virusne RNA HPIV 3 (Human parainfluenza virus 3 (ATCC Code: VR-93™), pri 1E+05 TCID50/ml). Ukupno je obavljeno pet ciklusa pozitivnih i negativnih uzoraka koristeći metodu testiranja temeljenu na rasporedu u obliku šahovske ploče, koja omogućuje naizmjenično raspoređivanje uzoraka.

Za *Respiratory Virus Mix I* reaction tube, 60 od 60 pozitivnih uzoraka ispravno je detektirano, a 59 od 60 negativnih uzoraka dalo je negativan rezultat, što daje stopu podudarnosti od 98,33 %. Za *Respiratory Virus Mix II reaction tube*, svi pozitivni uzorci ispravno su detektirani, a svi negativni uzorci dali su negativan rezultat. Prema rezultatima obje reakcijske epruvete, stopa unakrsne kontaminacije bila je gotovo 0 %.

12.6. Stopa zatajenja cijelog sustava

Robusnost (parametar stope zatajenja cijelog sustava) analizirana je prema indikacijama zajedničkih specifikacija za uređaje namijenjene detekciji ili kvantifikaciji markera infekcije virusom SARS-CoV-2.–Te preporuke odnosile su se samo na ciljni virus SARS-CoV-2, ostali ciljevi nisu analizirani u tom testu.

Kako bi se pokazalo da *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System može detektirati nisko pozitivne uzorke na RNA virusa SARS-CoV-2, testirano je 119 negativnih uzoraka nazofaringealnih briseva s dodatkom First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146) pri koncentraciji virusa ekvivalentnoj tri puta većoj od LoD (3xLoD) primjenom testa VIASURE.

Rezultati studije pokazuju da su svi replikati bili reaktivni na ciljnu RNA virusa SARS-CoV-2, što odgovara stopi podudarnosti od 100 %. Zaključno, stopa zatajenja cijelog sustava iznosi 0 %.

12.7. Analitička specifičnost i reaktivnost

Analitička specifičnost i analitička reaktivnost za *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System procijenjene su *in silico* i eksperimentalno, primjenom različitih početnih materijala kao što su certificirani referentni sojevi, certificirane referentne RNA/DNA te materijali iz programa vanjskih osiguravanja kvalitete (EQA).

12.7.1. Analitička specifičnost

Analitička specifičnost sposobnost je testa da detektira predviđenu metu. Za analitičku specifičnost treba razmotriti dvije komponente: Unakrsnu reaktivnost i interferenciju. Unakrsna reaktivnost može se pojaviti kada su prisutne genetski povezane sekvence u uzorku bolesnika, dok se interferencija može pojaviti ako prisutnost specifičnih tvari koje su potencijalno prisutne u matricama uzorka utječe na učinkovitost testa RT-qPCR.

Analiza *in silico* unakrsna reaktivnost

Unakrsna reaktivnost procijenjena je primjenom referentnih sekvenci patogena iz NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i internog softvera za bioinformatičku analizu. Provedena je BLAST analiza za svaku početnicu i sondu preko NCBI Genbank baze podataka o nukleotidima te interna bioinformatička analiza.

Usklađene sekvence s postotkom usklađenosti manjim od 80 % homologije smatrane su neosjetljivima za detekciju. Dobiveni rezultati pokazali su da su **sve analizirane sekvence bile ispod 80 % homologije s kompletima početnica i sondi za viruse SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B i RSV (tipovi A i B) uključenim u *Respiratory Virus Mix* / reaction tube; te s kompletima početnica i sondi za viruse parainfluenca (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63 i HKU1), metapneumovirus i adenovirus uključenim u *Respiratory Virus Mix* // reaction tube.**

U slučaju Koronavirus OC43, dobiveni su sljedeći rezultati:

Koronavirus OC43

BLAST analiza filtrirana prema koronavirusu OC43 (isključujući OC43 taksonomski ID: 31631) pokazuje visoku homologiju između početnica i sonde te betakoronavirusa 1 iz sojeva goveda, bivola, oriksa, žirafe, deve, psa, konja, svinje, kunića, Sable antilope, Sambar jelena, tapira, vodenog jelena, močvarne antilope, Watusija, jelena bijelog repa, jaka. Međutim, ti virusi nisu identificirani u ljudi i za sada se ne smatraju zoonotskim virusima, stoga ne ometaju detekciju koronavirusa OC43.

Stoga nijedna od analiziranih sekvenci, uključujući one koje pokazuju homologiju veću od 80 %, ne može utjecati na ispravnu detekciju koronavirusa OC43.

Zaključno, ciljni dizajni virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), ljudski koronavirus (229E, NL63, HKU1 i OC43), metapneumovirus i adenovirus u *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ne bi smjeli uzrokovati lažno pozitivne rezultate prilikom detekcije tih mikroorganizama u prisutnosti drugih organizama.

Analitička specifičnost: eksperimentalni test

Unakrsne reaktivnosti: eksperimentalni test

Unakrsna reaktivnost *VIASURE Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System potvrđena je testiranjem panela različitih mikroorganizama povezanih s respiratornim infekcijama s dodatkom u nazofaringealni bris prikupljen sustavom BD™ Universal Viral Transport System. Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući virusi i bakterije ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 cfu (jedinica koja formira koloniju)/ml za bakterije i 1E+04 – 1E+05 pfu (jedinica koja formira plak)/ml za viruse). Nije zabilježena unakrsna reaktivnost između bilo kojih od sljedećih testiranih mikroorganizama, izuzev za ciljane mikroorganizme.

Testiranje unakrsne reaktivnosti					
Adenovirus tip 15 (vrsta D), soj 35 [955, CH.38]	+/-	Virus Influenza A A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Adenovirus tip 2, vrsta C	+/-	Virus Influenza A A/Hawaii/31/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Adenovirus tip 3, vrsta B	+/-	Virus Influenza A A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443, UK varijanta	+/-
Adenovirus tip 31 (vrsta A), soj 1315/63	+/-	Virus Influenza A A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528, UK varijanta	+/-
Adenovirus tip 37	+/-	Virus Influenza A A/Qatar/1123/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 B.1.351	+/-

Testiranje unakrsne reaktivnosti					
Adenovirus tip 4, vrsta E	+/-	Virus Influenza A A/South Dakota/6/2007 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 koronavirus 2 soj 2019-nCoV/USA-WA1/2020	+/-
Adenovirus tip 40, soj Dugan	+/-	Virus Influenza A A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1)	+/-	SARS-CoV-2 Delta varijanta B.1.617.2	+/-
Adenovirus tip 41 (vrsta F), soj Tak	+/-	Virus Influenza A A/Taiwan/760/2007 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2	+/-
Adenovirus tip 5, vrsta C	+/-	Virus Influenza A A/Texas/71/2007 (H3N2)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2	+/-
Adenovirus tip 6 (vrsta C), soj Tonsil 99	+/-	Virus Influenza B B/Bangladesh/3333/2007 (linija Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2	+/-
Adenovirus tip 7A, vrsta B	+/-	Virus Influenza B B/Brisbane/3/2007 (linija Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2.75	+/-
Adenovirus ljudski adenovirus DNA tip 2	+/-	Virus Influenza B B/Pennsylvania/5/2007 (linija Victoria)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2.75	+/-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus Influenza B B/Pennsylvania/7/2007 (linija Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.4	+/-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus Influenza B B/Santiago/4364/2007 (linija Yamagata)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.4	+/-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Influenza B B/Victoria/304/2006 (linija Victoria)	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.4	+/-
<i>Bordetella pertussis</i> tipni soj	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> podvrsta <i>Pneumoniae</i> soj PCI 602	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5	+/-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 (ST47)	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5	+/-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> soj CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 (ST62)	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5	+/-
Coronavirus HKU	+/-	<i>Legionella pneumophila</i> podvrsta <i>Pneumophila</i> soj Philadelphia-1	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5	+/-
Coronavirus soj NL63	+/-	MERS-CoV soj Florida/USA-2_Saudi Arabia_2014	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ.1	+/-
Enterovirus D58 US/MO/14-18949	-	<i>Moraxella catarrhalis</i> soj 59632	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ.1	+/-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ1.1	+/-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> soj PI 1428	-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ1.1	+/-
<i>Haemophilus influenzae</i> soj L-378	-	Parainfluenza virus tip 2	+/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija XBB	+/-
Ljudski rinovirus 17 soj 33342	-	Parainfluenza virus tip 3	- +/-	SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija XBB	+/-
Virus Influenza A A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	+/-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 izolat Australia/VIC01/2020	+/-

Testiranje unakrsne reaktivnosti					
Virus Influenza A A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2)	+/-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> soj RH 815	-	SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1	+/-
Virus Influenza A A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	+/-	RSV A 2000/3-4	+/-	SARS-CoV-2	+/-
Virus Influenza A A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1)	+/-	RSV soj A-2	+/-	<i>Staphylococcus epidermis</i> soj PCI 1200	-
Virus Influenza A A/California/07/2009 (H1N1)pdm09	+/-	RSV tip B	+/-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus Influenza A A/California/07/2009 NYMC X- 179A (H1N1)pdm09	+/-	SARS-CoV-1 soj Frankfurt 1	+/-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> soj [CIP 104225]	-
Virus Influenza A A/Cambodia/0371/2007 (H1N1)	+/-				

Tablica 43. Referentni patogeni mikroorganizmi uključeni u test unakrsne reaktivnosti. Rezultat + ili – odnosi se na pozitivni ili negativni rezultat dobiven u različitim kanalima ovisno o detektiranom cilju. Ako je testirani mikroorganizam jedan od ciljeva koje detektira uređaj, dobiva se pozitivan rezultat u odgovarajućem kanalu, ali negativni rezultat u ostalim kanalima.

Zaključno, rezultati testova unakrsne reaktivnosti ukazuju na visoku specifičnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za detekciju ciljanih mikroorganizama, čime se minimizira rizik od lažno pozitivnih rezultata. Budući da nisu uočene nespecifične amplifikacije s drugim povezanim mikroorganizmima, to sugerira da je uređaj sposoban precizno razlikovati ciljeve.

Studija koinfekcije

Provedena je studija koinfekcije koristeći referentne sojeve detaljno opisane u tablici 28 za reprezentativne ciljeve odabrane za svaki kanal fluorescencije: SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, virus parainfluenza tip 3, koronavirus OC43, metapneumovirus i adenovirus; u različitim koncentracijama, kako bi se potvrdilo da prisutnost bilo kojeg od njih, neovisno o koncentraciji, ne mijenja detekciju između njih. Analizirano je devet nazofaringealnih uzoraka s dodatkom referentnog materijala, pri čemu je jedan cilj bio u niskoj koncentraciji (3xLoD), a ostali ciljevi u vrlo visokoj koncentraciji, obično 1E+04 – 1E+05 jedinica/ml, ako je bilo moguće.

Rezultati potvrđuju da detekcija ciljanih mikroorganizama nije promijenjena kada se analizira s VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System u koinfekciji pri različitim koncentracijama.

Studija interferirajućih mikrobioloških agensa

Provedena je studija interferirajućih mikrobioloških agensa kako bi se analizirali potencijalni interferirajući mikrobiološki agensi koji ometaju VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Testiran je panel različitih mikroorganizama povezanih s respiratornim bolestima u prisutnosti virusa SARS-CoV-2, Influenza A i B, RSV B, virusa parainfluenza tip 3, koronavirusa OC43, metapneumovirusa i adenovirusa (referentni sojevi detaljno opisani u tablici 28) pri 3xLoD. Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući virusi i bakterije ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 CFU (jedinica koja formira koloniju)/ml za bakterije i 1E+04 – 1E+05 pfu (jedinica koja formira plak)/ml za viruse). Svaka točkasta analiza provedena je dvaput po uzorku.

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara negativnoj nazofaringealnoj matrici s dodatkom specifičnih ciljnih sojeva bez ikakvih interferirajućih mikrobnih agensa, dok NMC odgovara negativnoj nazofaringealnoj matrici bez ikakvih interferirajućih mikrobnih agensa.

<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube i <i>Respiratory Virus Mix II</i> reaction tube		
Naziv mikroorganizma	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	N/A	N.I
NMC	N/A	N.I
Ljudski rinovirus 17	1,60E+04 TCID50/ml	N.I
Enterovirus D58	4,00E+04 TCID50/ml	N.I
MERS-CoV	3,55E+03 TCID50/ml	N.I
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	3,16E+04 TCID50/ml	N.I
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,80E+03 CFU/μL	N.I
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+05 CFU/ml	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+06 CFU/ml	N.I
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,60E+06 CFU/ml	N.I
SARS-CoV 1	5,20E+02 kop/ml	N.I
<i>Bordetella pertussis</i>	1,20E+05 CFU/ml	N.I
<i>Bordetella holmesii</i>	4,10E+04 CFU/ml	N.I
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,20E+05 CFU/ml	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+04 CFU/μL	N.I
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,00E+06 CFU/ml	N.I
<i>Legionella pneumophila</i> podvrsta. <i>pneumophila</i>	5,60E+04 CFU/μL	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,20E+03 CFU/μL	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+06 CFU/ml	N.I
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	1,00E+03 kop/μL	N.I

Tablica 44. Test na interferirajuće mikrobne agense. N.I. = Nema interferencije.

Zaključno, nije uočena interferencija u detekciji ciljne nukleinske kiseline s bilo kojim testiranim mikroorganizmima.

Studija interferirajućih tvari

Provedena je studija interferirajućih tvari kako bi se testirao potencijalni interferirajući učinak endogenih i egzogenih tvari na VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. Ukupno dvadeset potencijalno interferirajućih tvari dodano je negativnoj nazofaringealnoj matrici obogaćenju referentnim sojevima detaljno opisanim u tablici 28 za viruse SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV B, parainfluenza tip 3, koronavirus OC43, metapneumovirus i adenovirus i ocijenjeno sa šest replikata.

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara negativnoj nazofaringealnoj matrici s dodatkom specifičnih ciljnih sojeva bez interferirajuće tvari, dok NMC odgovara negativnoj nazofaringealnoj matrici bez interferirajuće tvari i bez dodatnih mikroorganizama/referentnog materijala. Dobiveni su sljedeći rezultati:

<i>Respiratory Virus Mix I reaction tube i Respiratory Virus Mix II reaction tube</i>		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Oseltamivir	3,99E-04 mg/ml	N.I.
Zanamivir	3,30 mg/ml	N.I.
Azitromicin	1,10E-02 mg/ml	N.I.
Mupirocin	1,50E-03 mg/ml	N.I.
Tobramicin	3,30E-02 mg/ml	N.I.
Albumin	1,00E+01mg/ml	N.I.
Genomska DNA	3,50E-03 mg/ml	N.I.
Ljudska sluz	1,00 % (v/v)	N.I.
Mucin	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Trigliceridi	1,50E+01 mg/ml	N.I.
Puna krv	1,00 % (v/v)	N.I.
Karbocistein	5,00E+00mg/ml	N.I.
N-acetilcistein	1,50E-01 mg/ml	N.I.
Fenilefrin	3,00E-05mg/ml	N.I.
Flutikazon	1,26E-06 mg/ml	I
	3,15E-07 mg/ml	N.I.
<i>Galphimia glauca</i> , <i>luffa operculata</i>	1,25E+01 mg/ml	N.I.
Oksimetazolin hidroklorid	1,00E-01mg/ml	N.I.
Natrijev klorid	9,00E-01mg/ml	N.I.
Nikotin	3,00E-02mg/ml	I
	7,50E-04 mg/ml	N.I.
Benzokain	3,00E+00mg/ml	N.I.

Tablica 45. Potencijalne interferirajuće tvari. N.I.: Nema prijavljene interferencije, I: Interferencija.

Na VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System testirane su različite potencijalno interferirajuće tvari, endogene i egzogene. Uočena je interferencija prilikom testiranja flutikazona (1,26E-06 mg/ml) i nikotina (3,00E-02 mg/ml) kako u *Respiratory Virus Mix I* reaction tube tako i u *Respiratory Virus Mix II* reaction tube te je provedeno razrjeđivanje 1/4 kako bi se procijenilo da taj interferirajući učinak nije uočen pri nižim koncentracijama. Dobiveni rezultati navode na zaključak da pri konačnim koncentracijama koje su testirane nije uočena interferencija bilo koje od ocijenjenih tvari pri testiranim koncentracijama.

12.7.2. Analitička reaktivnost

Analitička reaktivnost može se definirati kao postotak ciljnih sojeva mikroba ili uzoraka DNA/RNA koji daju ispravan pozitivan rezultat. Analitička reaktivnost proučavana je *in silico* i eksperimentalnim analizama.

Analiza *in silico* analitičke reaktivnosti

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System procijenjena je korištenjem javno dostupne baze podataka o nukleotidnim sekvencama kao što je NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Global Initiative on Sharing All SARS-CoV-2 Data (GISAID EpiCoV database (<https://www.gisaid.org/>)), Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID EpiFlu database (<https://www.gisaid.org/>)), Global Initiative on Sharing All RSV Data (GISAID EpiRSV database (<https://www.gisaid.org/>)) i internog softvera za bioinformatičku analizu kako bi se pokazalo da se ciljni geni mogu ispravno detektirati ispitivanim uređajem. *In silico* analiza dizajna početnica i sonde provedena je kroz usklađivanje sa sekvencama dostupnim u bazi podataka zbirke nukleotida (nr/nt). Rezultati dobiveni nakon analize uključenih sekvenci prikazani su u sljedećoj tablici:

Mikroorganizam	Gen	% eksperimentalno detektiranih sekvenci bez nepodudaranja	% eksperimentalno detektiranih sekvenci s nepodudaranjima	Broj poravnatih sekvenci
SARS-CoV-2	Gen <i>N</i> , regija N1 i regija N2	98,08 %	-	22.404
Influenza A	Geni <i>HA</i> + <i>M1</i>	0,88 %	32,92 %	99.326
Influenza B	Gen <i>M1</i>	21,63 %	70,58 %	24.369
RSV A	Gen <i>N</i>	2,32 %	80,83 %	4.002
RSV B	Gen <i>N</i>	2,61 %	80,11 %	4.172
Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4	Gen <i>HN</i> Gen <i>HN</i> Gen <i>HN</i> Gen <i>F</i>	19,23 %	-	1451
Koronavirus OC43	Gen <i>N</i>	76,32 %	-	380
Koronavirus 229E	Gen <i>N</i>	0,00 %*	-	266
Koronavirus NL63	Gen <i>N</i>	48,12 %	-	293
Koronavirus HKU1	Gen <i>N</i>	46,51 %	-	215
Metapneumovirus	Gen <i>F</i>	93,7 %	-	2.144

Mikroorganizam	Gen	% eksperimentalno detektiranih sekvenci bez nepodudaranja	% eksperimentalno detektiranih sekvenci s nepodudaranjima	Broj poravnatih sekvenci
Adenovirus A	Gen <i>hexon</i>	98,7 %	-	154
Adenovirus B	Gen <i>hexon</i>	98,75 %	-	718
Adenovirus C	Gen <i>hexon</i>	96,17 %	-	392
Adenovirus D	Gen <i>hexon</i>	97,74 %	-	310
Adenovirus E	Gen <i>hexon</i>	89,53 %	-	172
Adenovirus F	Gen <i>hexon</i>	96,40 %	-	250
Adenovirus G	Gen <i>hexon</i>	90,48 %	-	21

Tablica 46. Test analitičke reaktivnosti *in silico*.

*Većina sekvenci koronavirusa 229E iz NCBI GenBank uključena u *in silico* analizu ima 1 ili 2 nepodudarnosti koje ne utječu na ispravnu detekciju cilja. Osim toga, sintetska DNA koronavirusa 229E korištena tijekom analitičke validacije proizvoda pokazuje 100 %-tnu homologiju s kompleksom početnica i sonde, čime se eksperimentalno dokazuje njegova ispravna detekcija.

Ukratko, analiza inkluzivnosti pokazala je ispravnu detekciju virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4), koronavirus (NL63, 229E, HKU1 i OC43), metapneumovirus i adenovirus s VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Analitičke reaktivnosti: eksperimentalni test

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za SARS-CoV-2 procijenjena je prema RNA iz sljedećih sojeva s dodatkom u nazofaringealni bris prikupljen sustavom BD™ Universal Viral Transport System, pokazujući pozitivne rezultate:

SARS-Related Coronavirus 2, izolat USA-WA1/2020, Gamma-Irradiated (NR-52287), Quantitative Synthetic SARS-CoV-2 RNA: ORF, E, N (VR-3276SD), Genomic RNA from 2019 Novel Coronavirus (VR-1986D), 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Testing (NAT) (NIBSC 20/110), Research Reagent for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC 19/304), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1 (MT007544.1): SARS-CoV-2 izolat Australia/VIC01/2020 (Twist Bioscience 102019), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 2 (MN908947.3): SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1 (Twist Bioscience 102024), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14 (B.1.1.7_710528), UK varijanta (Twist Bioscience 103907), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15 (B.1.1.7_601443), UK varijanta (Twist Bioscience 103909), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16 (EPI_ISL_678597), Južnoafrička varijanta (Twist Bioscience 104043), Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17 (EPI_ISL_792683), Japanska/Brazilska varijanta (Twist Bioscience 104044), Accuplex™ SARS-CoV-2 Verification Panel (SeraCare c0505-0129), AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 RNA CONTROL (MBC139-R), AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL (SWAB) (MBTC030-R), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-R), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5 (SCV2_23C1A-01), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2 (SCV2_23C1A-02), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5 (SCV2_23C1A-03), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.4 (SCV2_23C1A-05), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.4 (SCV2_23C1B-01), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5 (SCV2_23C1B-03), SARS-CoV-2 Omicron

varijanta, podlinija BA.4 (SCV2_23C1B-04), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2 (SCV2_23C1B-05), SARS-CoV-2 Delta varijanta B.1.617.2 (SCV2_24C1B-01), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2.75 (SCV2_23C1C-01), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ.1 (SCV2_23C1C-02), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ1.1 (SCV2_23C1C-03), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija XBB (SCV2_23C1C-04), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2 (SCV2_23C1C-05), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija XBB (SCV2_23C1D-01), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ1.1 (SCV2_23C1D-02), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.2.75 (SCV2_23C1D-03), SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BQ.1 (SCV2_23C1D-04) i SARS-CoV-2 Omicron varijanta, podlinija BA.5 (SCV2_23C1D-05).

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za virus Influenza A procijenjena je prema RNA iz sljedećih sojeva, pokazujući pozitivne rezultate:

Virus Influenza A, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) (FR-1), Virus Influenza A, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) (FR-3), Virus Influenza A, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) (FR-5), Virus Influenza A, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) (FR-6), Virus Influenza A, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) (FR-7), Virus Influenza A, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) (FR-8), Virus Influenza A, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) (FR-12), Virus Influenza A, A/Texas/71/2007 (H3N2) (FR-13), Virus Influenza A, A/Brisbane/10/2007 IVR-147 (H3N2) (FR-27), Virus Influenza A, A/Brisbane/59/2007 IVR-148 (H1N1) (FR-28), Virus Influenza A, A/South Dakota/6/2007 X-173 (H1N1) (FR-29), Virus Influenza A, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 (FR-201), Virus Influenza A, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 (FR-202), Virus Influenza A, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 (FR-203), Virus Influenza A, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 (FR-245), Virus Influenza A, A/California/07/2009 NYMC X-179A (H1N1)pdm09 (FR-246), Influenza A/Victoria/2570/2019 (H1N1) i/ili Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2) (cjepivo Fluarix Tetra 2022/2023), Influenza A/Victoria/4897/2022 (H1N1) i/ili Influenza A/Darwin/6/2021 (H3N2) (cjepivo Fluarix Tetra 2023/2024), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (Viracell MBTC031-R) i Virus Influenza A, H3/H2N2 (CAP ID3-09 2023).

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za virus Influenza B procijenjena je prema RNA iz sljedećih sojeva, pokazujući pozitivne rezultate:

Virus Influenza B, B/Pennsylvania/7/2007 (linija Yamagata) (FR-16), Virus Influenza B, B/Santiago/4364/2007 (linija Yamagata) (FR-17), Virus Influenza B, B/Brisbane/3/2007 (linija Yamagata) (FR-18), Virus Influenza B, B/Pennsylvania/5/2007 (linija Victoria) (FR-19), Virus Influenza B, B/Victoria/304/2006 (linija Victoria) (FR-20), Virus Influenza B, B/Bangladesh/3333/2007 (linija Yamagata) (FR-183), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-R), Influenza B/Austria/1359417/2021 i/ili Influenza B/Phuket/3073/2013 (cjepivo Fluarix Tetra 2022/2023), Influenza B/Austria/1359417/2021 i/ili Influenza B/Phuket/3073/2013 (cjepivo Fluarix Tetra 2023/2024).

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za RSV procijenjena je prema RNA iz humanog respiratornog sincicijskog virusa A (soj A-2) (FR-294), humanog respiratornog sincicijskog virusa, A 2000/3-4 (NR-28530), AMPLIRUN TOTAL SARS-CoV-2-FluA-FluB-RSV CONTROL (MBTC031-R) i humanog respiratornog sincicijskog virusa, B (INSTAND 359043), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za parainfluencu procijenjena je prema RNA iz virusa Parainfluenca serotip 1 (NIBSC 08/176), virusa Parainfluenca serotip 2 (NIBSC 08/178), virusa Parainfluenca serotip 4 (NIBSC 08/180), virusa Parainfluenca 2 (PINFRNA101S-06) i virusa Parainfluenca 3 (PINFRNA22S-02), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za koronavirus procijenjena je prema RNA iz kvantitativne sintetske RNA humanog koronavirusa soj NL63 (VR-3263SD) i koronavirusa HKU (CVRNA22S-04), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za metapneumovirus procijenjena je prema RNA iz AMPLIRUN® METAPNEUMOVIRUS RNA CONTROL (MBC144-R), humanog metapneumovirusa (NIBSC 08/320) i Quantitative Synthetic Human metapneumovirus hMPV RNA (VR-3250SD), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System za adenovirus procijenjena je prema DNA iz sljedećih sojeva, pokazujući pozitivne rezultate:

Adenovirus tip 2, vrsta C (0810110CF), adenovirus tip 3, vrsta B (0810062CFHI), adenovirus tip 4, vrsta E (0810070CFHI), adenovirus tip 5, vrsta C (0810020CF), adenovirus tip 6 (vrsta C), soj Tonsil 99 (VR-6), adenovirus tip 7A, vrsta B (0810021CFHI), adenovirus tip 15 (vrsta D), soj 35 [955, CH.38] (VR-16), adenovirus tip 31 (vrsta A) soj 1315/63 (VR-3343), adenovirus tip 37 (0810119CFHI), adenovirus tip 40, soj Dugan (0810084CFHI), adenovirus tip 41 (vrsta F), soj Tak (0810085CFHI) i First WHO International Standard for Human Adenovirus DNA (NIBSC code: 16/324).

12.8. Metrološka sljedivost

Ovaj test nije osmišljen u svrhe mjerenja.

13. Značajke kliničke učinkovitosti

Klinička učinkovitost VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System testirana je korištenjem nazofaringealnog brisa koji je prikupilo medicinsko osoblje koristeći fleksibilni najlonski sterilni bris i stavljajući ga u sterilnu epruvetu koja sadrži 3 ml Universal Transport Media® (UTM®) (Copan). Dobiveni su sljedeći rezultati:

	Centar	Vrsta uzorka	Hodogram	Cilj
1	Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Španjolska)	Nazofaringealni bris (retrospektivna studija)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza A
				Influenza B
				RSV (tipovi A i B)
				Parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4)
				Koronavirus (OC43, NL63, 229 i HKU1)
				Metapneumovirus
				Adenovirus

Tablica 47. Mjesto, vrsta uzorka, radni proces i cilj.

Istinski pozitivne i negativne vrijednosti, lažne pozitivne i negativne vrijednosti, vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System izračunate su u odnosu na svaki komparativni test kako je prikazano u sljedećoj tablici:

Centar	Analiza usporednog lijeka	Cilj	TP	TN	FP	FN	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B assay (Roche)	SARS-CoV-2	110	733	7	6	0,95 (0,89 – 0,98)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,94 (0,88 – 0,97)	0,99 (0,98 – 0,99)	100,3 (47,9 – 209,8)	0,052 (0,02 – 0,11)
		Influenza A	143	699	4	10	0,94 (0,88 – 0,97)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,97 (0,93 – 0,99)	0,99 (0,97 – 0,99)	164,3 (61,8 – 436,8)	0,066 (0,04 – 0,12)
		Influenza B	29	826	0	1	0,97 (0,83 – 0,99)	1 (0,99 – 1)	1 (0,88 – 1)	0,99 (0,99 – 1)	1574 (98,4 – 25172)	0,048 (0,01 – 0,23)
	Allplex™ RV Essential Assay (Seegene)	Influenza A	143	699	4	10	0,94 (0,88 – 0,97)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,97 (0,93 – 0,99)	0,99 (0,97 – 0,99)	164,3 (61,8 – 436,8)	0,066 (0,04 – 0,12)
		Influenza B	29	826	0	1	0,97 (0,83 – 0,99)	1 (0,99 – 1)	1 (0,88 – 1)	0,99 (0,99 – 1)	1574 (98,4 – 25172)	0,048 (0,01 – 0,23)
		RSV (tipovi A i B)	60	787	6	3	0,95 (0,87 – 0,99)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,91 (0,82 – 0,96)	0,99 (0,98 – 0,99)	125,9 (56,61 – 279,9)	0,048 (0,01 – 0,15)
		Parainfluenza (tipovi 1, 2, 3 i 4)	74	765	9	8	0,90 (0,82 – 0,96)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,90 (0,82 – 0,95)	0,99 (0,98 – 0,99)	77,61 (40,38 – 149,2)	0,099 (0,05 – 0,19)
		Metapneumovirus	73	778	1	4	0,95 (0,87 – 0,99)	0,99 (0,99 – 1)	0,99 (0,93 – 0,99)	0,99 (0,98 – 0,99)	738,5 (104,1 – 5240)	0,052 (0,02 – 0,14)
		Adenovirus	64	786	5	1	0,99 (0,92 – 1)	0,99 (0,98 – 0,99)	0,93 (0,84 – 0,97)	0,99 (0,99 – 1)	155,8 (65 – 373,4)	0,015 (0,002 – 0,11)

	Allplex™ Respiratory Panel 3 (Seegene) + sekvenciranje	Koronavirus (OC43, NL63, 229 i HKU1)	39	813	2	2	0,95 (0,84 – 0,99)	0,99 (0,99 – 1)	0,95 (0,84 – 0,99)	0,99 (0,99 – 1)	387,6 (96,9 – 1549,9)	0,049 (0,013 – 0,189)
--	--	--	----	-----	---	---	-----------------------	--------------------	--------------------------	--------------------	-----------------------------	-----------------------------

Tablica 48. Istinski pozitivne (TP) i negativne (TN) vrijednosti, lažno pozitivne (FP) i lažno negativne (FN) vrijednosti, osjetljivost, specifičnost, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Zaključno, rezultati pokazuju visoku podudarnost u detekciji virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV (tipovi A i B), parainfluenca (tipovi 1, 2, 3 i 4), koronavirus (OC43, NL63, 229E i HKU1), metapneumovirus i adenovirus koristeći VIASURE *Respiratory Virus Extended Mix* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Literatura

- Abu-Raya, B., Viñeta Paramo, M., Reicherz, F., & Lavoie, P. M. (2023). Why has the epidemiology of RSV changed during the COVID-19 pandemic? *EClinicalMedicine*, 61, 102089. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.102089>
- Bergeron, H. C., & Tripp, R. A. (2021). Immunopathology of RSV: An Updated Review. *Viruses*, 13, 2478. <https://doi.org/10.3390/v13122478>
- Buckwalter, S. P., Teo, R., Espy, M. J., Sloan, L. M., Smith, T. F., & Pritt, B. S. (2012). Real-time qualitative PCR for 57 human adenovirus types from multiple specimen sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 766–771. <https://doi.org/10.1128/JCM.05629-11>
- CDC |. (2023). *COVID-19*. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/about-covid-19.html>
- Datta, N. (2023). A review of molecular biology detection methods for human adenovirus. *AIMS Biophysics*, 10(1), 95–120. <https://doi.org/10.3934/BIOPHY.2023008>
- Fernández-Pérez, G. C., Oñate Miranda, M., Fernández-Rodríguez, P., Velasco Casares, M., Corral de la Calle, M., Franco López, Díez Blanco, M., & Cuchat, J. M. O. (2021). SARS-CoV-2: cómo es, cómo actúa y cómo se expresa en la imagen. *Radiología*, 63, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2020.10.006>
- Friedman, N., Alter, H., Hindiyeh, M., Mendelson, E., Avni, Y. S., & Mandelboim, M. (2018). Human Coronavirus Infections in Israel: Epidemiology, Clinical Symptoms and Summer Seasonality of HCoV-HKU1. *Viruses*, 10. <https://doi.org/10.3390/v10100515>
- Gaunt, E. R., Hardie, A., Claas, E. C. J., Simmonds, P., & Templeton, K. E. (2010). Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 48(8), 2940–2947. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
- Henrickson, K. J. (2003). Parainfluenza Viruses. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 16(2), 242–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Ison, M. G., & Hayden, R. T. (2016). Adenovirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4), DMIH2-0020–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Jansen, R. R., Schinkel, J., Koekkoek, S., Pajkrt, D., Beld, M., De Jong, M. D., & Molenkamp, R. (2011). Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of Clinical Virology*, 51, 179–

185. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.04.010>

Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(3), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>

Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, 4(26), 1–28. <https://doi.org/10.3390/diseases4030026>

Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37, 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>

Safiabadi Tali, S. H., LeBlance, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpuor, B., Armanfard, N., Sagan, S. M., & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), e00228–20.

Schuster, J. E., & Williams, J. V. (2013). Human Metapneumovirus. *Pediatrics in Review*, 34(12), 558–565.

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Beersma, M. F. C., Kroes, A. C. M., & Claas, E. C. J. (2004). Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 42(4), 1564–1569. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1564-1569.2004>

Tyrrell, carina S., Allen, J. L. Y., & Gkrania-Klotsas, E. (2021). Influenza: epidemiology and hospital management. *Medicine (Abingdon, England : UK Ed.)*, 49(12), 797–804.

Uddin, S., & Thomas, M. (2020). Human Metapneumovirus. In *StatsPearls*. StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00226-7>

Uyeki, T. M., Hui, D. S., Zambon, M., Wentworth, D. E., & Monto, A. S. (2022). Influenza. *The Lancet*, 400, 693–706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00982-5)

WHO | World Health Organization. (n.d.). *Respiratory Syncytial Virus (RSV) disease*. Retrieved August 10, 2023, from <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccine-standardization/respiratory-syncytial-virus-disease>

WHO | World Health Organization. (2023a). *Coronavirus disease (COVID-19)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19))

WHO | World Health Organization. (2023b). *Influenza (Seasonal)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

Zeng, Z.-Q., Chen, D.-H., Tan, W.-P., Qiu, S.-Y., Xu, D., Liang, H.-X., Chen, M.-X., Li, X., Lin, Z.-S., Liu, W.-K., & Zhou, R. (2018). Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 363–369. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3144-z>

Simboli za IVD komponente i reagense

 IVD In vitro dijagnostički uređaj	 Čuvati na suhom	 Rok valjanosti	 Proizvođač	 LOT Šifra serije
 Pogledajte upute za uporabu	 Ograničenje temperature	 Sadržaj dovoljan za <n> test(ova)	 UDI Jedinstveni identifikacijski broj uređaja	 REF Kataloški broj
 CE CE oznaka	 Držite podalje od sunčeve svjetlosti			

Robni žigovi

BD MAX™ je registrirani zaštitni znak kompanije Becton, Dickinson and Company.

Zadržana prava na promjenu. Sva prava pridržana. © Certest Biotec, S.L.

Svi drugi robni žigovi koji se mogu pojaviti u ovoj uputi o lijeku vlasništvo su njihovih vlasnika.



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Španjolska)

Tel. (+34) 976 520 354 | viasure@certest.es | www.certest.es

Podaci o australskom naručitelju

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Australija

Podaci o novozelandskom naručitelju

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, Novi Zeland

Kontrola promjene		
Verzija br.	Promjene	Datum
00	Izvorna verzija. Ova verzija je prijevod izvornog dokumenta engleski: IUo-444221en0825.00	01.8.2025.

Tablica A2. Tablica kontrole promjene.

Revizija: 1. kolovoza 2025.

VIASURE

by **certest**



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)



(+34) 976 520 354



viasure@certest.es



www.certest.es

certest

F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.