

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Flu A, Flu B & RSV
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
VIASURE <i>Flu A, Flu B & RSV</i> Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444200/ VS-ABR124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Referência do produto a usar com o BD MAX™ System.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and RNA extraction.....	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	12
10.	Limitations of the test	13
11.	Quality control.....	15
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	15
12.2.	Analytical sensitivity	16
12.3.	Analytical specificity	17
12.4.	Analytical reactivity	19

Índice

1.	Utilização prevista	21
2.	Introdução e explicação	21
3.	Princípio do procedimento	22
4.	Reagentes fornecidos	22
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	22
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	23
7.	Precauções para o utilizador.....	23
8.	Procedimento do teste	24
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	24
8.2.	Preparação da amostra e extração de ARN.....	25
8.3.	Protocolo de PCR.....	25
9.	Interpretação dos resultados.....	29

10.	Limitações do teste.....	31
11.	Controlo de qualidade	32
12.	Características do teste	32
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	32
12.2.	Sensibilidade analítica.....	33
12.3.	Especificidade analítica.....	34
12.4.	Reatividade analítica	36
	Bibliography/ Bibliografia	38
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes.....	38
	Trademarks.....	39

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection and differentiation of RNA from the Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) and/or Human Respiratory Syncytial Virus A/B (RSV) in nasopharyngeal and oropharyngeal samples from individuals suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of the presence of the Flu A, Flu B and/or RSV viral RNA. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ system. RNA is extracted from respiratory specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Flu A, Flu B and RSV.

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Influenza A	475/520	<i>M1</i> gene
Influenza B	585/630	<i>M1</i> gene
RSV	630/665	<i>N</i> gene
Internal Control (IC)	530/565	-

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Flu A, Flu B & RSV</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	1A foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-ABR124 (444200).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916)
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 or 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, the product can be used up to 28 days.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).

- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested nasopharyngeal/oropharyngeal swabs that were obtained by flexible nasopharyngeal nylon flocked swabs, immediately placed in viral transport medium (Vircell, Spain). Additional respiratory specimens from symptomatic patients could be tested according to the literature (i.e. nasal/deep nasal/nasopharyngeal swabs, combined nasal and oropharyngeal swab, nasopharyngeal/nasal/tracheal aspirates, nasopharyngeal/nasal/oropharyngeal washes, bronchoalveolar lavage (BALs), sputum). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage, and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 5 days, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 5 days), we recommend shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 5 days or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The nasopharyngeal/oropharyngeal swabs must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) and the 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).

8.2. Sample preparation and RNA extraction

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

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

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

8.3. PCR protocol

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

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 µL.
 - a. Example: If pipette 200 µL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 µL.
 - b. Note: maximum setting is 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1A (concerning Flu A, Flu B & RSV reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).

- c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
- a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	Flu A	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	300	0	35
585/630 (ROX)	Flu B	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation, in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

- 10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

- 11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

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

Table 5. PCR protocol.

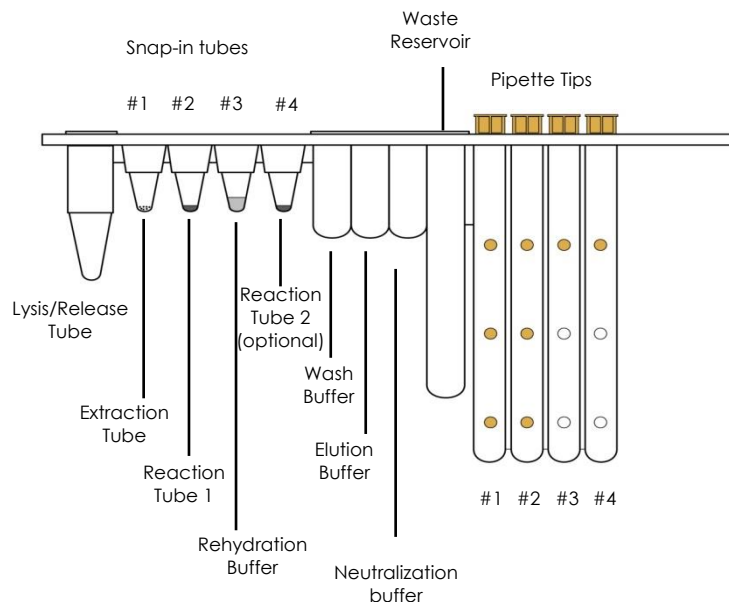
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.

- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white colour coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of *Flu A*, *Flu B* & *RSV* reaction tubes (1A foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green colour coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminium pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue colour coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminium pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-colour coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

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

Results should be read and analysed using the following table:

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- ¹	Flu A, Flu B and RSV RNA Detected ¹
+	-	-	+/- ¹	Flu A RNA Detected, Flu B and RSV RNA Not Detected ¹
+	+	-	+/- ¹	Flu A and Flu B RNA Detected, and RSV RNA Not Detected ¹
+	-	+	+/- ¹	Flu A and RSV RNA Detected, and Flu B RNA Not Detected ¹
-	+	-	+/- ¹	Flu B RNA Detected, Flu A and RSV RNA Not Detected ¹
-	+	+	+/- ¹	Flu B and RSV RNA Detected, Flu A RNA Not Detected ¹
-	-	+	+/- ¹	RSV RNA Detected, Flu A and Flu B RNA Not Detected ¹
-	-	-	+ ²	Flu A, Flu B and RSV RNA Not Detected ²
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct ≤ 35). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swabs.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Flu A, Flu B and/or RSV, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown Flu and/or RSV variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A negative IC signal does not preclude the presence of Flu and/or RSV RNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences.
- Negative results do not preclude Flu and/or RSV infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by novel Influenza A strain have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that Flu and/or RSV infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with clinical suspicion of respiratory viral infections. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec using samples from Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Spain)	nasopharyngeal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Influenza A
				Influenza B
				RSV

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity values for VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	CLART® PneumoVir DNA array assay + Flu A, Flu B & RSV-OSR for BD MAX™ (BioGX)	Influenza A	38	50	0	3	0.92 (0.80-0.98)	1 (0.92-1)
		Influenza B	5	86	0	0	1 (0.47-1)	1 (0.95-1)
		RSV	15	76	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.95-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid Test	Influenza A	159	180	0	5	0.97 (0.93-0.99)	1 (0.98-1)
		Influenza B	100	241	3	0	1 (0.96-1)	0.98 (0.96-0.99)
		RSV	25	318	1	0	1 (0.86-1)	0.99 (0.98-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity and specificity values for VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

In order to evaluate the compatibility of different sample matrices (nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab and nasopharyngeal/oropharyngeal swab in VTM from Vircell), a compatibility study have been carried out. The obtained results showed that the three different sample matrices were compatible with the *Flu A*, *Flu B* & RSV reaction tube.

Results show high agreement to detect Flu A, Flu B and RSV using VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit of ≥ 10 genome copies per reaction for *Flu A*, ≥ 20 genome copies per reaction for *Flu B* and ≥ 2 genome copies per reaction for RSV with a positive rate of $\geq 95\%$ (Figure 2, 3 and 4) on nasopharyngeal samples.

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

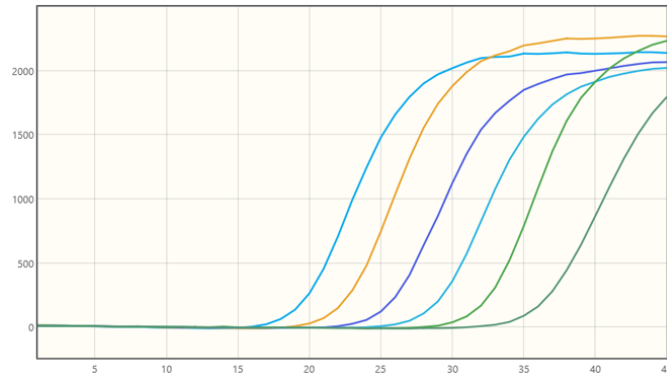


Figure 3. Dilution series of *Flu B* (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

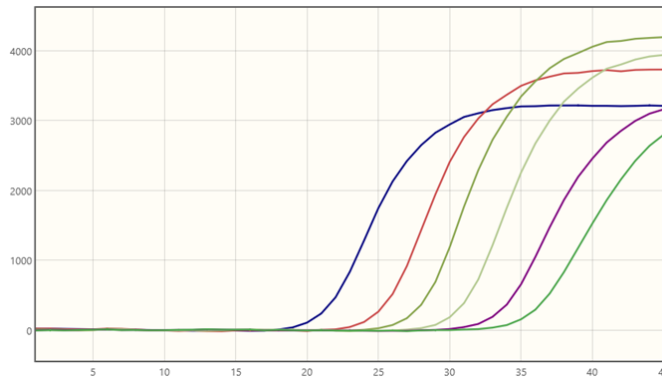
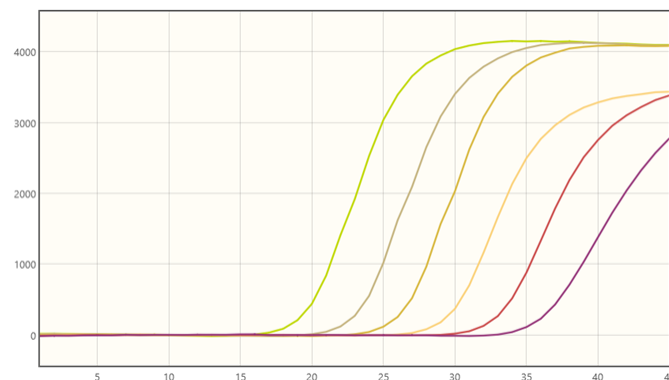


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Flu A, Flu B and RSV assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus	-/+
Bocavirus	-	Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017 virus	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016 virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/207/06 virus	-/+
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus	-/+
MERS Coronavirus	-	Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Nevada/3/2011 virus	-/+
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-/+	Influenza B/New Jersey/1/2012 virus	-/+
SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus	-/+	Influenza B/Texas/02/2013 virus	-/+
SARS-CoV-2 strain 2019-nCoV/Italy-INMI1	-	Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus	-/+	Influenza B/Townsville/8/2016 virus	-/+
SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020	-	Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Canberra/11/2016 virus	-/+
SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	-	Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Florida/4/2006 virus	-/+
SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020	-	Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Florida/07/2004 virus	-/+
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Guangdong/120/2000 virus	-/+

Cross-reactivity testing					
Enterovirus Echovirus 11 and 30	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) virus	-/+
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/ Jiangsu/10/2003 virus	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus	-/+	Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus	-/+
Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus	-/+
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Texas/06/2011 virus	-/+
Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus	-/+
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus	-/+
Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus	-/+	<i>Legionella bozemanii</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus	-/+	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus	-/+	<i>Legionella micdadei</i>	-
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus	-/+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus	-/+	Human metapneumovirus A and B	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus	-/+	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus	-/+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus	-/+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus	-/+	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus	-/+	Human rhinovirus type C	-

Cross-reactivity testing					
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4) virus	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-/+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus	-/+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus	-/+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B (strain CH93(18)-18)	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+	Human Respiratory Syncytial Virus strain Long	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus	-/+		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of the VIASURE *Flu A, Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza A** was evaluated against RNA extracted from the following strains: Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-

IDCDC-RG12 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) virus (Clade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus, Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IB CDC-1 virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus, Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus, showing positive result.

The reactivity of the VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza B** was evaluated against RNA extracted from the following strains: Influenza B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Colorado/6/2017 virus, Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus, Influenza B/Maryland/15/2016 virus, Influenza B/Netherlands/207/06 virus, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, Influenza B/Nevada/3/2011 virus, Influenza B/New Jersey/1/2012 virus, Influenza B/Texas/02/2013 virus, Influenza B/Townsville/8/2016 virus (**B/Victoria lineage**); Influenza B/Canberra/11/2016 virus, Influenza B/Florida/4/2006 virus, Influenza B/Florida/07/2004 virus, Influenza B/Guangdong/120/2000 virus, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) virus, Influenza B/Jiangsu/10/2003 virus, Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus, Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus, Influenza B/Phuket/3073/2013 virus, Influenza B/Texas/06/2011 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus (**B/Yamagata lineage**), showing positive result.

The reactivity of the VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **RSV** was confirmed against RNA extracted from RSV A and B (strain CH93(18)-18) and Human Respiratory Syncytial Virus strain Long, showing positive result.

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System é um teste de RT-PCR em tempo real automatizado concebido para a deteção qualitativa e diferenciação de ARN dos vírus Influenza A (Gripe A), Influenza B (Gripe B) e/ou vírus sincicial respiratório (VSR) A/B em amostras nasofaríngeas e orofaríngeas de indivíduos com suspeita de infeção respiratória pelo respetivo prestador de cuidados de saúde. Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar na identificação da presença de ARN viral dos vírus Influenza A, Influenza B e/ou VSR. O ensaio utiliza o BD MAX™ System para levar a cabo a extração automática de ARN e subsequente RT-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com reagentes universais e descartáveis para o BD MAX™ System. O ARN é extraído de espécimes respiratórios, amplificado utilizando RT-PCR e detetado utilizando sondas marcadas com moléculas fluorescentes específicas para os vírus Influenza A, Influenza B e VSR.

2. Introdução e explicação

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e causam a maior parte das infeções víricas do aparelho respiratório inferior. A Influenza A e B são uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, considerando que as pessoas de idade avançada e comprometidas estão especialmente em risco de desenvolver doenças graves e complicadas como a pneumonia. As pessoas com influenza, sentem algum ou todos estes sintomas: febre ou sensação febril/arrepios, tosse, dor de garganta, congestão e secreção nasal, mialgia, dor de cabeça e anorexia. O vírus influenza pode-se transmitir de pessoa para pessoa de duas formas diferentes: através do ar (gotas e aerossóis que ocorrem ao tossir e espirrar), e por contacto direto ou indireto.

O genoma dos vírus de Influenza A e B é um vírus de ARN encapsulado, de cadeia simples, formado por oito segmentos de ARN que codificam 11 ou 12 proteínas virais. O envelope viral, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, consiste numa bicamada lipídica que contém proteínas transmembrana, como hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), e proteínas da matriz M1 e M2. Os vírus Influenza A classificam-se em subtipos baseados na antigenicidade das suas moléculas "HA" e "NA" enquanto que os Influenza B dividem-se em 2 linhagens antigénicas Victoria e Yamagata.

Os vírus sinciciais respiratórios (Human respiratory syncytial viruses)(RSV) A e B humanos pertencem à família *Paramyxoviridae* e são os agentes de causa viral mais importantes de infeções respiratórias agudas. O RSV é um vírus encapsulado cujo genoma consiste num ARN de cadeia simples linear de sentido negativo não segmentado. O Vírus Sincicial Respiratório é o principal agente causador de infeções respiratórias como bronquite, pneumonia e infeções pulmonares obstrutivas crónicas em pessoas de todas as idades. Os doentes afetados sentem frequentemente alguns ou todos estes sintomas: rinorreia, febre baixa, tosse, dor de garganta, dor de cabeça e sibilos. O RSV pode ser transmitido através de gotículas de secreções nasofaríngeas de pessoas infetadas, contacto direto, ou autoinoculação após tocar em superfícies contaminadas.

O diagnóstico clínico pode ser problemático, já que um grande número de agentes patogénicos causadores de infeções respiratórias agudas dão lugar a quadros clínicos semelhantes. Os ensaios de PCR em tempo real demonstraram ser um dos métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos para a deteção dos vírus Influenza A, Influenza B e RSV.

3. Princípio do procedimento

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a identificação de Influenza A, Influenza B e/ou RSV em amostras respiratórias. A deteção realiza-se através de um formato Real Time RT-PCR numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. O ARN alvo isolado é transcrito, gerando ADN complementar por transcriptase reversa, à qual se segue a amplificação de uma região conservada do gene *M1* para Flu A e Flu B e de uma região conservada do gene *N* para RSV, utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da exonuclease 5' da polimerase do ADN. Durante a amplificação do ADN, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade do modelo alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para levar a cabo a PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase, transcriptase reversa) em formato estabilizado, assim como um controlo interno para monitorizar o processo de extração e/ou a inibição da atividade da polimerase.

Alvo	Canal	Gene
Influenza A	475/520	Gene <i>M1</i>
Influenza B	585/630	Gene <i>M1</i>
VSR	630/665	Gene <i>N</i>
Controlo interno (IC)	530/565	-

Tabela 1. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Código de barras	Quantidade
<i>Flu A, Flu B & RSV</i> reaction tube	Uma mistura de enzimas, oligonucleótidos/sondas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Selo 1A	2 envelopes de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com a Ref.ª VS-ABR124 (444200).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais e equipamento necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916)
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.º: 442827 ou 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.º: 437519)
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Pontas com filtro.
- Luvas não reutilizáveis sem pó.

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado até 28 dias.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais e técnicos de laboratório ou de saúde, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de casa utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Em casos em que outros testes de PCR estejam a ser realizados na mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de garantir que o VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, o BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, eventuais reagentes adicionais necessários para o ensaio e o BD MAX™ System não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).

- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Usar vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os VIASURE Real Time PCR Detection Kits não requerem Fichas de Dados de Segurança do Material (Safety Data Sheets) tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System testou esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos obtidos com cotonetes flocados de nylon nasofaríngeos flexíveis, imediatamente colocados em meio de transporte viral (Vircell, Espanha). Segundo a literatura poderiam ainda ser utilizados espécimes respiratórios adicionais de doentes sintomáticos (ou seja, esfregaços nasais/nasais profundos/nasofaríngeos, esfregaços nasais e orofaríngeos combinados, aspirados nasofaríngeos/nasais/traqueais, lavagens nasofaríngeas/nasais/orofaríngeas, lavagens broncoalveolares (LBA), expetoração). Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte de espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas entre 2 °C e 8 °C durante um período máximo de 5 dias, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de

material patogénico. Para transportes de longa duração (mais de 5 dias), é recomendado o envio a uma temperatura de -20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2 °C e 8 °C por um período máximo de 5 dias ou podem ser congeladas a -20 °C ou, idealmente, a -70 °C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

Os esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos têm de ser colhidos, transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) e as orientações da 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).

8.2. Preparação da amostra e extração de ARN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

Quando utilizar amostras nasofaríngeas e/ou orofaríngeas:

1. Colher com uma pipeta 200-400 µL do espécime clínico respiratório para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do teste PCR para o VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se já tiver sido criado o teste para o VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode ignorar o passo 8.3.1 e ir diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador de informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX™, em seguida, selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5))".
- 6) Em "Sample extraction parameters" selecionar "User defined" e ajustar o volume da amostra ao volume do espécime clínico utilizado mais 550 µL.

- a. Exemplo: Se for colhido com uma pipeta 200 µL de um espécime clínico respiratório num BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, o parâmetro deve ser ajustado para 750 µL.
- b. Nota: o volume máximo é 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior, em "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
- Snap-In 2 Barcode (Código de barras da posição de encaixe 2): 1A (relativamente ao *Flu A, Flu B & RSV reaction tube*)
 - Snap-In 3 Barcode (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao *Rehydration Buffer tube*).
 - Snap-In 4 (Barcode Código de barras da posição de encaixe 4): outro tubo de reação VIASURE (selo diferente) caso se opte pelo formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
- Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX™; neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para as posições de encaixe 2 (verde) e 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
475/520 (FAM)	Influenza A	60	100	0	40
530/565 (HEX)	CI	80	300	0	35
585/630 (ROX)	Influenza B	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	VSR	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 3. Definições de PCR.

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).

		False Receiving Channel (Canal receptor falso)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	0,0	-	2,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	4,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabela 4. Parâmetros de interação espectral.

11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Reverse transcription (Transcrição reversa)	Retenção	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/extensão (recolha de dados))	2- Temperatura	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabela 5. Protocolo de PCR.

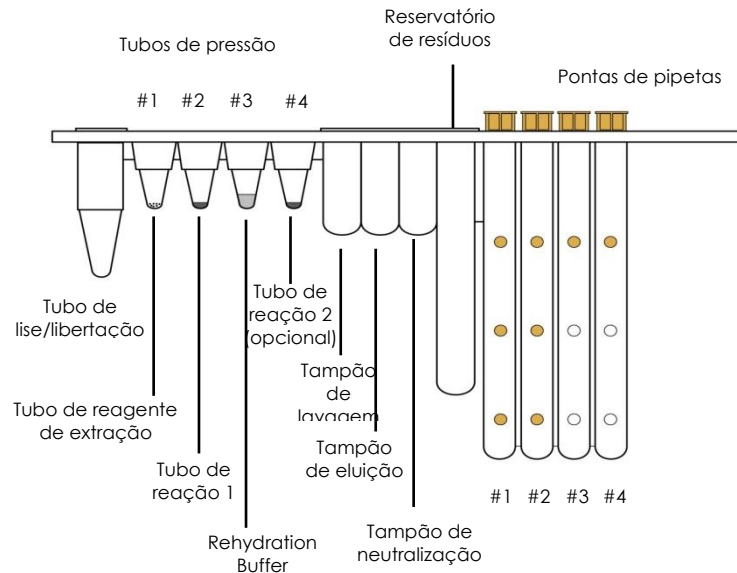
12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System Rack

- 1) Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (posição de encaixe 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- 3) Determinar e separar o número adequado de *Flu A*, *Flu B* & *RSV* reaction tube (selo 1A) e colocá-los nas posições correspondentes da tira (posição de encaixe 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - b. Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
 - i. Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (com selo de cor diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição de encaixe 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.

- a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tira de reagente BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu de lista pendente "Test", selecionar VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de introdução manual.
- 5) Preencher a janela "Specimen/Patient ID" (ID de amostra/doente) e "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra (Sample Buffer Tubes). Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os Sample Buffer Tube estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra (Sample Buffer Tube) preparado no(s) BD MAX™ Rack(s) (suportes para tubos do BD MAX™ System).
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) ou "Export" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do BD MAX™ System.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

Influenza A (475/520)	Influenza B (585/630)	VSR (630/665)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
+	+	+	+/-1	ARN de Influenza A, Influenza B e VSR detetado ¹
+	-	-	+/-1	ARN de Influenza A detetado, e ARN Influenza B e VSR não detetado ¹
+	+	-	+/-1	ARN de Influenza A e Influenza B detetado, e ARN de VSR não detetado ¹
+	-	+	+/-1	ARN de Influenza A e VSR detetado, e ARN de Influenza B não detetado ¹
-	+	-	+/-1	ARN de Influenza B detetado, ARN de Influenza A e VSR não detetado ¹
-	+	+	+/-1	ARN de Influenza B e VSR detetado, ARN de Influenza A não detetado ¹
-	-	+	+/-1	ARN de VSR detetado, ARN de Influenza A e Influenza B não detetado ¹
-	-	-	+2	ARN de Influenza A, Influenza B e VSR não detetado ²
-	-	-	-2	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ²
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 6. Interpretação da amostra.

+: Houve amplificação.
-: Não houve amplificação.

1 Uma amostra é considerada positiva se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno (CI) poderá mostrar ou não um sinal de amplificação. Por vezes, a deteção do CI não é necessária porque um elevado número de cópias do alvo pode causar uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.

2 Uma amostra é considerada negativa se não for detetado um sinal de amplificação no sistema de deteção mas o controlo interno for positivo ($Ct \leq 35$). A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno. Em caso de resultados não resolvidos (UNR), ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio.

No caso de um resultado ambíguo contínuo, recomenda-se rever as instruções de utilização e o processo de extração empregue pelo utilizador, verificar o desempenho correto de todas as etapas do RT-qPCR e rever os parâmetros, e verificar o formato sigmoide da curva e a intensidade da fluorescência.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Este ensaio pode ser utilizado com diferentes tipos de amostras, ainda que apenas tenha sido validado com esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de falsos positivos devido à contaminação cruzada com Flu A, Flu B e/ou RSV, quer pelas amostras que contêm elevadas concentrações de ARN alvo quer pela contaminação por arraste a partir de produtos de PCR de reações anteriores.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ARN).
 - Degradação do ARN viral durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas dos vírus da gripe e/ou RSV.
 - Uma carga viral no espécime abaixo do limite de deteção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes.
 - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- Um sinal de IC negativo não exclui a presença de ARN dos vírus da gripe e/ou RSV num espécime clínico.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de vírus viáveis e não significa que estes vírus são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. Contudo, um resultado positivo é indicador da presença de sequências virais alvos.
- Resultados negativos não excluem a infeção por vírus da gripe e/ou RSV, e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. Não foram determinados os tipos de espécimes ideais e o momento em que se alcançam os níveis virais máximos durante as infeções causadas pela nova estirpe do Influenza A. Pode ser necessária a colheita de vários espécimes (tipos e pontos temporais) do mesmo doente para detetar o vírus.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infeção por vírus da gripe e/ou RSV, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.

- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, com o VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System será necessário repetir o teste. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém um controlo interno (IC) em cada tubo de reação que confirma o desempenho correto da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras clínicas respiratórias (esfregaços nasofaríngeos) de doentes com suspeita clínica de infeções virais respiratórias. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	CerTest Biotec, utilizando amostras do Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza, Espanha)	esfregaço nasofaríngeo	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Influenza A
				Influenza B
				VSR

Tabela 7. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparador conforme indicado nas tabelas seguintes:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
1	CLART® PneumoVir DNA array assay + Flu A, Flu B & RSV-OSR for BD MAX™ (BioGX)	Influenza A	38	50	0	3	0,92 (0,80-0,98)	1 (0,92-1)
		Influenza B	5	86	0	0	1 (0,47-1)	1 (0,95-1)
		VSR	15	76	0	0	1 (0,78-1)	1 (0,95-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid Test	Influenza A	159	180	0	5	0,97 (0,93-0,99)	1 (0,98-1)
		Influenza B	100	241	3	0	1 (0,96-1)	0,98 (0,96-0,99)
		VSR	25	318	1	0	1 (0,86-1)	0,99 (0,98-1)

Tabela 8. Valores positivos (TP) e negativos verdadeiros (TN), valores positivos (FP) e negativos falsos (FN), valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

De modo a avaliar a compatibilidade de diferentes matrizes de amostra (esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo e esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo em VTM da Vircell), foi realizado um estudo de compatibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que as três diferentes matrizes de amostra eram compatíveis com o tubo de reação *Flu A*, *Flu B* & RSV reaction tube.

Os resultados mostram uma elevada concordância para detetar os vírus Influenza A, Influenza B e VSR utilizando o VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção ≥ 10 cópias do genoma por reação para Flu A, ≥ 20 cópias do genoma por reação para Flu B e ≥ 2 cópias do genoma por reação para o RSV, com uma taxa positiva $\geq 95\%$ (Figuras 2, 3 e 4) em amostras nasofaríngeas.

Figura 2. Diluições em série de um modelo de Influenza A ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ cópias por reação) no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

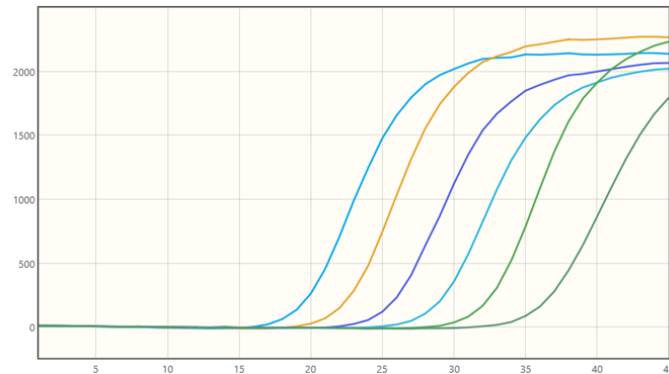


Figura 3. Diluições em série de um modelo de Influenza B ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ cópias por reação) no BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

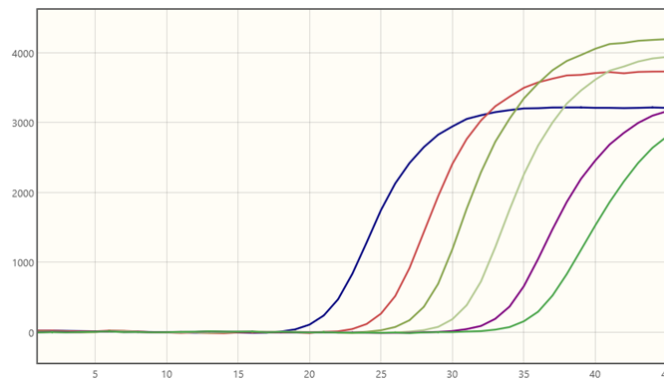
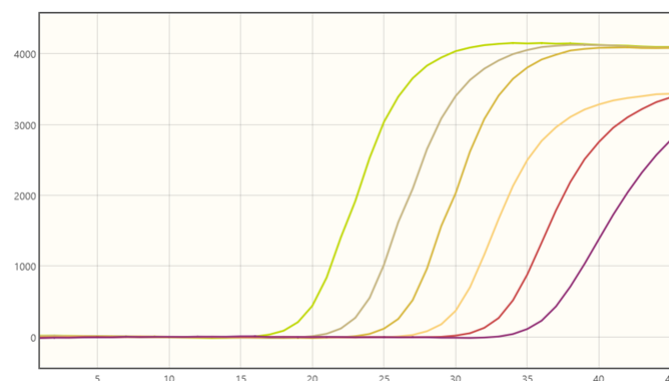


Figura 4. Diluições em série de um modelo de RSV ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ cópias por reação) no BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio de Flu A, Flu B e RSV foi confirmada testando um painel composto por diferentes micro-organismos que representam os agentes patogénicos respiratórios mais comuns. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre os seguintes microrganismos testados, exceto os agentes patogénicos visados em cada ensaio:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a)	-/+	Vírus Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
Bocavirus	-	Vírus Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a)	-/+	Vírus Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Vírus Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Vírus Influenza A/New York/39/2012 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Vírus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Malaysia/2506/2004	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> CM-1	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Netherlands/207/06	-/+
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A)	-/+
Coronavírus MERS	-	Vírus Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Nevada/3/2011	-/+
Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	-/+	Vírus Influenza B/New Jersey/1/2012	-/+
SARS-CoV-2 estirpe BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-	Vírus Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C)	-/+	Vírus Influenza B/Texas/02/2013	-/+
SARS-CoV-2 estirpe 2019-nCoV/Italy-INMI1	-	Vírus Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Townsville/8/2016	-/+
Isolado de SARS-CoV-2 Austrália/VIC01/2020	-	Vírus Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Canberra/11/2016	-/+
Isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1	-	Vírus Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza B/Florida/4/2006	-/+
SARS-CoV-2 estirpe 2019nCoV/USAWA1/2020	-	Vírus Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Florida/07/2004	-/+
Enterovírus 68 e 71	-	Vírus Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Guangdong/120/2000	-/+

Teste de reatividade cruzada					
Enterovirus Echovirus 11 e 30	-	Vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)	-/+
Enterovirus Cocksackievirus A24, A9 e B3	-	Vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/ Jiangsu/10/2003	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a	-/+	Vírus Influenza B/Massachusetts/2/2012	-/+
Vírus Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3)	-/+
Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-/+
Vírus Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Texas/06/2011	-/+
Vírus Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Wisconsin/1/2010	-/+
Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)	-/+	Vírus Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A	-/+
Vírus Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1)	-/+	Vírus Influenza A/Egypt/3300- NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)	-/+	<i>Legionella bozemanii</i>	-
Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-/+	Vírus Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29	-/+	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Vírus Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	-/+	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30	-/+	<i>Legionella micdadei</i>	-
Vírus Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/India/NIV/2006 xPR8- IBCDC-RG7 (H5N1)	-/+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Vírus Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Vírus Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)	-/+	Metapneumovirus A e B humano	-
Vírus Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	-/+	Vírus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	-/+	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Vírus Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)	-/+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Vírus Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)	-/+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> não resistente a rifampicina	-
Vírus Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)	-/+	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
Vírus Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1 e g885652	-
Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Duck/Singapore- Q/F119-3/97 (H5N3)	-/+	Rinovirus humano tipo C	-

Teste de reatividade cruzada					
Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4)	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> , subespécie <i>aureus</i>	-
Vírus Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v	-/+	Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-/+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Vírus Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v	-/+	Vírus Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)	-/+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Vírus Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Vírus Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)	-/+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Vírus Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)	-/+	Vírus Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+	Vírus sincicial respiratório (RSV) A e B (estirpe CH93(18)-18)	-/+
Vírus Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v	-/+	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-/+	Vírus Sincicial Respiratório (RSV) humano estirpe Long	-/+
Vírus Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v	-/+	Vírus Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)	-/+		

Tabela 9. Microrganismos patogénicos de referência utilizados neste estudo.

12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System no caso do **Influenza A** foi avaliada comparativamente com ARN extraído das seguintes estirpes: vírus Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1), vírus Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, vírus IVR-180 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09, vírus Influenza A/PR/8/34 (H1N1), vírus Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2), vírus Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2), vírus Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2), vírus Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2), vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), vírus Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v, vírus Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v, vírus Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2), vírus Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2), vírus Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2), vírus Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v, vírus Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v, vírus Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), vírus Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), vírus Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2), vírus Influenza A/New York/39/2012 (H3N2), vírus Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2), vírus Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2), vírus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), vírus Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2), vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2), vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), vírus Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2), vírus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1), vírus Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C), vírus Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2), vírus Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2), vírus Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2), vírus Influenza A/Anhui/01/2005

(H5N1), vírus Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1), vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1), vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1), vírus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a, vírus Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1), vírus Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1), vírus Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1), vírus Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1), vírus Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1), vírus Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1), vírus Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29, vírus Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), vírus Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30, vírus Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1), vírus Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1), vírus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), vírus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1), vírus Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1), vírus Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1), vírus Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, vírus Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3), vírus Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4), vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8), vírus Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8), vírus Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), vírus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), vírus Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9), vírus Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9), vírus Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), vírus Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2), vírus Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26, revelando resultado positivo.











A reatividade do VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System no caso do **Influenza B** foi avaliada comparativamente com ARN extraído das seguintes estirpes: vírus Influenza B/Brisbane/60/2008, vírus Influenza B/Colorado/6/2017, vírus Influenza B/Malaysia/2506/2004, vírus Influenza B/Maryland/15/2016, vírus Influenza B/Netherlands/207/06, vírus Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A), vírus Influenza B/Nevada/3/2011, vírus Influenza B/New Jersey/1/2012, vírus Influenza B/Texas/02/2013, vírus Influenza B/Townsville/8/2016 (**B/linhagem Victoria**); vírus Influenza B/Canberra/11/2016, vírus Influenza B/Florida/4/2006, vírus Influenza B/Florida/07/2004, vírus Influenza B/Guangdong/120/2000, vírus Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39), vírus Influenza B/Jiangsu/10/2003, vírus Influenza B/Massachusetts/2/2012, vírus Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3), vírus Influenza B/Phuket/3073/2013, vírus Influenza B/Texas/06/2011, vírus Influenza B/Wisconsin/1/2010, vírus Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A (**B/linhagem Yamagata**), revelando resultado positivo.

A reatividade do VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System no caso do **VSR** foi confirmada comparativamente com ARN extraído de VSR A e B (estirpe CH93 (18)-18) e vírus sincicial respiratório humano estirpe Long, revelando resultado positivo.

Bibliography/ Bibliografia

1. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
2. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
3. R.L. Kuo *et al.* Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
4. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
5. French, *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
6. X. Yu *et al.* Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
7. N. Mazur *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
8. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
 - A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41 (1): 149-154.
9. M. Hindiyeh *et al.* Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51 (7): 2421-2424.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i></p>	 <p>Keep dry Armazenar em local seco</p>	 <p>Use by Data de validade</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code (Lot) Código do lote</p>
 <p>Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização</p>	 <p>Temperature limitation Limitação de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contém <n> teste(s)</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de amostra</p>	 <p>Catalog number Número de referência</p>

Trademarks

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º	Changes / Alterações	Date / Data
00	Original Version/Versão original	19/11/2021

Table A 2. Control change table / Tabela de controlo de alterações

Revision: 19th November 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

