

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Flu A, Flu B & RSV

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

Handbook for the following references/

Manual para as seguintes referências:

BD REF 444200

to be used with BD MAX™

para ser utilizado com BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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



3. Principle of the procedure

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

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

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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



8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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

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

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

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

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

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE *Flu A, Flu B & RSV*.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".



- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5"
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 550 µL.
 - a. Example: If pipette 200 µL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 750 µL.
 - b. Note: maximum setting is 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional Viasure for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 2. PCR settings.

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

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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 4. PCR protocol.

- 11) Click the "Save Test" button.



8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each specimen to be tested, remove one Unitized Reagent Strips (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* reaction tubes (red foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry on a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area where the seal sheet is of the tube or to the foil seal.
 - i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (purple foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to carry out a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

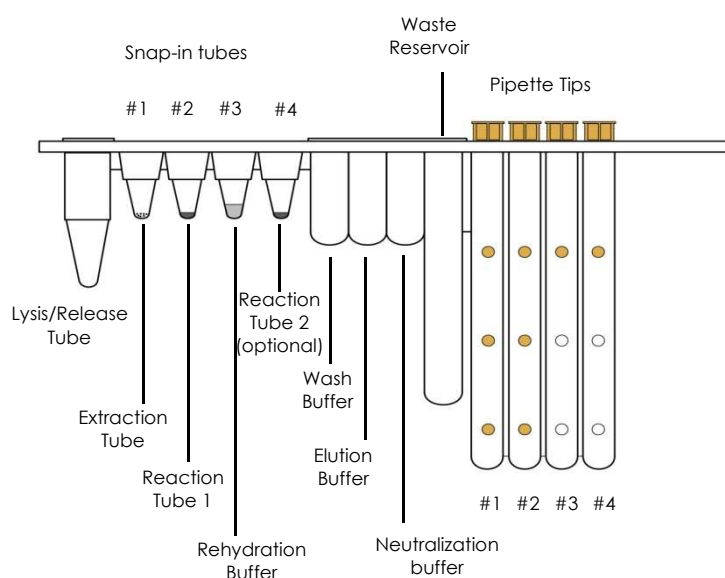


Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.

8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

8.3.4 BD MAX™ Report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

Using the following table read and analyze the results:



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

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

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

10. Limitations of the test

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



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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

The results were as follows:

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

Table 6. Comparative results for Flu A.

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

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

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

Table 7. Comparative results for Flu B.

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

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



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

Table 8. Comparative results for RSV.

Positive percent agreement is >84% and negative percent agreement is >99%.

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

The results show a high sensitivity and specificity to detect Influenza A, Influenza B and/or RSV viruses using VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit.

12.1. Analytical sensitivity

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for Flu A, Flu B and RSV with a positive rate of $\geq 95\%$ (Figure 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^4 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

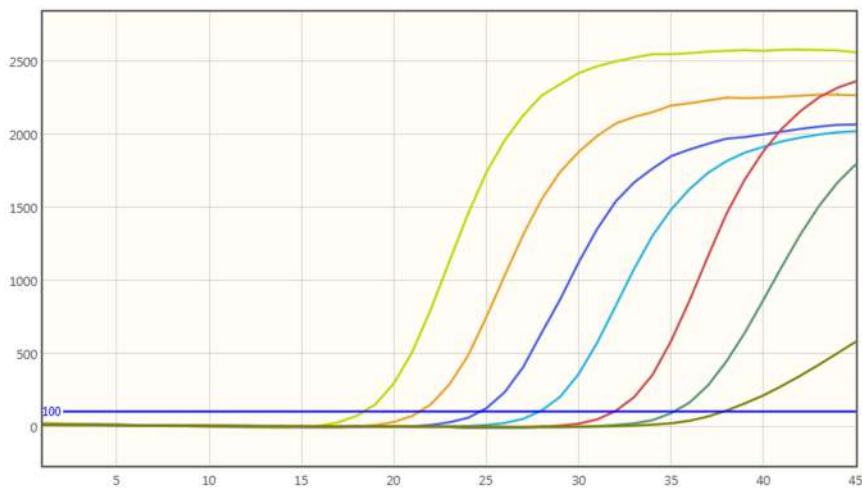


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

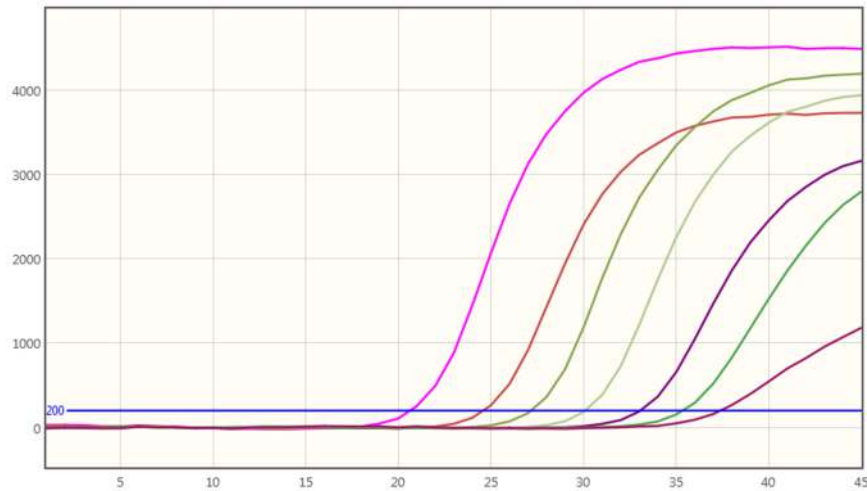
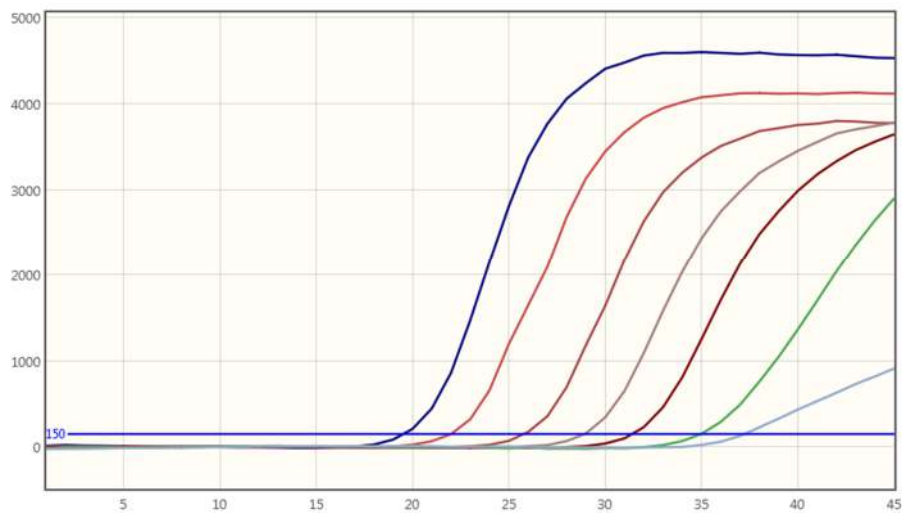


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^0 copies/rxn) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.2. Analytical specificity

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



Cross-reactivity testing					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Florida/04/06 virus	-/+
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Enterovirus Echovirus types 11 and 30	-	A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Human metapneumovirus A and B	-	A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV)	-/+
Human coronavirus 229E	-	A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.3. Analytical reactivity

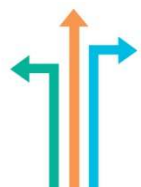
The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit for Flu A was evaluated against strains: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 and A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C), A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus



(clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) and A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection kit for Flu B was evaluated against strains: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 and B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016 showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV* Real Time PCR Detection kit for RSV was evaluated against Human Respiratory Syncytial Virus (RSV A and B), showing positive results.



PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit foi concebido para a identificação e diferenciação específica dos vírus Influenza A e Influenza B (gripe A e/ou B) e/ou Vírus Sincicial Respiratório (VSR) humano em amostras respiratórias procedentes de pacientes com sinais e sintomas de infeção respiratória. A utilização prevista do teste é facilitar o diagnóstico de infeção causada por Influenza A, Influenza B, e/ou VSR em combinação com fatores de riscos clínicos e epidemiológicos. Este ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para levar a cabo a extração de ARN e posterior RT-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com os reagentes universais e descartáveis do sistema BD MAX™. As amostras clínicas de ARN são detetadas utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para Influenza A, Influenza B e VSR.

2. Introdução e explicação

O vírus Influenza pertence 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 morbilidade 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.

O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) humano pertence à família *Paramyxoviridae* e são os agentes de causa viral mais importantes das infeções respiratórias agudas. O VSR 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 frequentemente sentem alguns ou todos estes sintomas: rinorreia, febre baixa, tosse, dor de garganta, dor de cabeça e sibilos. O VSR 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 VSR.



3. Procedimento

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit foi concebido para o diagnóstico de Influenza A, Influenza B e/ou RSV em amostras respiratórias. A detecção realiza-se através de um formato RT em tempo real numa única etapa onde a transcriptase reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. Através do isolamento do RNA, sintetiza-se o DNA complementar à sequência-alvo graças à transcriptase reversa. Seguidamente a identificação de Influenza A, Influenza B e RSV é levada a cabo através da reação em cadeia da polimerase utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência que hibridem com uma região-alvo conservada do gene *M1* para Influenza A e Influenza B e do gene *N* para RSV.

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit baseia-se na atividade de exonuclease de 5' da DNA-polimerase. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidroliza a sonda unida à sequência de DNA complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade de RNA alvo. Esta fluorescência pode ser monitorizada no sistema BD MAX™.

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit contém em cada tudo todos os componentes necessários para levar a cabo a PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicas, dNTPs, tampão, polimerase, transcriptase reversa) em formato estabilizado, assim como, um controlo interno para descartar a inibição da atividade da polimerase. Através da reação de amplificação, a Influenza A deteta-se no canal 475/520, a Influenza B deteta-se no canal 585/630, o RSV deteta-se no canal 630/665 e o controlo interno (CI) deteta-se no canal 530/565.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 1:

Referência	Reagente/Material	Descrição	Cor	Quantidade
VS-ABR212R	Gripe A, gripe B e RSV em tubo de reação	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Transparente Película vermelha	2 envelopes de 12 tubos
VS-RB05	Tubo de tampão de reidratação	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Transparente Película roxa	1 envelope de 24 tubos

Tabela 1. Reagentes e materiais fornecidos em VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit com Ref.ª VS-ABR124.

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit.

- Equipamento de PCR em tempo real: sistema BD MAX™.
- Kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.ª: 442828)



- Cartuchos de PCR BD MAX™ (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.
- Proteger os componentes da luz solar.

7. Precauções para o utilizador

- Para utilização profissional de 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 cada 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.
- No caso de outros ensaios de PCR que estejam a ser realizados dentro da mesma área do laboratório, certifique-se de que o teste VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3, qualquer outro reagente adicional que seja necessário para realizar o ensaio, e o sistema BD MAX™ não estão contaminados. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos de PCR.
- 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. Use vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na área de trabalho. Uma vez concluído o teste, lavar as mãos.
- Os espécimes devem ser tratados como potencialmente infecciosos assim como os reagentes que tenha estado em contacto com as amostras e devem ser manuseados de acordo com as regulamentações



nacionais de segurança. Tome as precauções necessárias durante a colheita, o armazenamento, o tratamento e a eliminação das amostras.

- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ S 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 foi validado com colheitas de exsudado faríngeo obtidas com esfregaços nasofaríngeos flexíveis de nylon. Após o qual, a amostra foi transferida imediatamente para o meio de transporte viral (Vircell, Espanha). Segundo a literatura poderiam ainda ser utilizados espécimes respiratórios adicionais de pacientes sintomáticos (por exemplo, esfregaços nasais/nasais profundos/nasofaríngeos, esfregaços nasais e faríngeos combinados, aspirações nasofaríngeas/nasais/traqueais, lavagens nasofaríngeas/nasais/faríngeas, lavagens broncoalveolares (LBA), expetoração), mas terão de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, o armazenamento e o transporte dos espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em contentores 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. Os espécimes devem ser transportados em conformidade com a normativa local e nacional para o transporte de amostras biológicas. Para transportes de longa duração (com mais de 24 horas), é recomendado o envio a ≤ -20 °C. As amostras podem ser armazenadas entre 2 a 8 °C até 24 horas ou podem ser congeladas a -20 °C ou -70 °C para sua conservação durante um período de tempo prolongado. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

8.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DE RNA

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

1. Colher com uma pipeta 200-400 µL do espécime clínico respiratório para um tubo de tampão de amostras do sistema (Tubo de tampão de amostra BD MAX™ TNA-3) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra um minuto a alta velocidade.
2. Ir para a secção “8.3 Funcionamento do sistema BD MAX™”.



8.3. FUNCIONAMENTO DO SISTEMA BD MAX™

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

8.3.1. Programação do teste VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit

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

- 1) No ecrã "Run" do sistema BD MAX™, selecionar o separador "Test Editor".
- 2) Clicar no botão "Create".
- 3) Na janela "Test Name", escrever o nome do teste: por ex., VIASURE Flu A, Flu B & RSV.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type", selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format", escolher "Type 5".
 - b. Nota: O produto pode ser utilizado junto com outros produtos de teste Viasure for BD MAX, em seguida, selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 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 tubo de tampão de amostra BD MAX TNA-3, o parâmetro deve ser ajustado para 750 µL.
 - b. Nota: o volume máximo é 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" selecionar "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) No separador "PCR settings" introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings", "Gains" e "Threshold" (Tabela 2).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado juntamente com outros produtos Viasure para um teste BD MAX™ adicional, neste caso completar "PCR Settings" e "Test Steps" para ambas as posições 2 (verde) e 4 (azul).

Canal	Aliás	Ganho	Limiar	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	Gripe A	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	300	0	40
585/630 (ROX)	Gripe B	60	200	0	40
630/665 (Cy5)	RSV	60	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 2. Definições de PCR.

- 9) No separador "PCR settings" introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Tabela 3)

		False Receiving Channel				
Excitation Channel	Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	2,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	4,0	-	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-

Tabela 3. Parâmetros "Spectral cross-talk".



- 10) No separador "Test Steps", introduzir o protocolo de PCR (Tabela 4).

Etapa	Tipo de perfil	Ciclos	Tempo (s)	Temperatura	Deteção
Transcriptase reversa	Retenção	1	900	45 °C	-
Desnaturação inicial	Retenção	1	120	98 °C	-
Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	2-Temperatura	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabela 4. Protocolo de PCR.

- 11) Clique no botão "Save Test".

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do sistema BD MAX™

- 1) Para cada espécimen, retirar uma tira de reagentes individual (BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA)) do kit de extração (BD MAX™ ExK TNA-3). 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 sistema BD MAX™.
- 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 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 tubos de reação do teste VIASURE *Flu A, Flu B & RSV* Real Time PCR Detection kit (selo vermelho) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 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, certifique-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.
 - i. Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 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 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 tubos de tampão de reidratação (selo roxo) e colocá-los na sua posição correspondente da tira (Posição 3, código de cor verde no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - a. Para uma transferência correta, certifique-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.



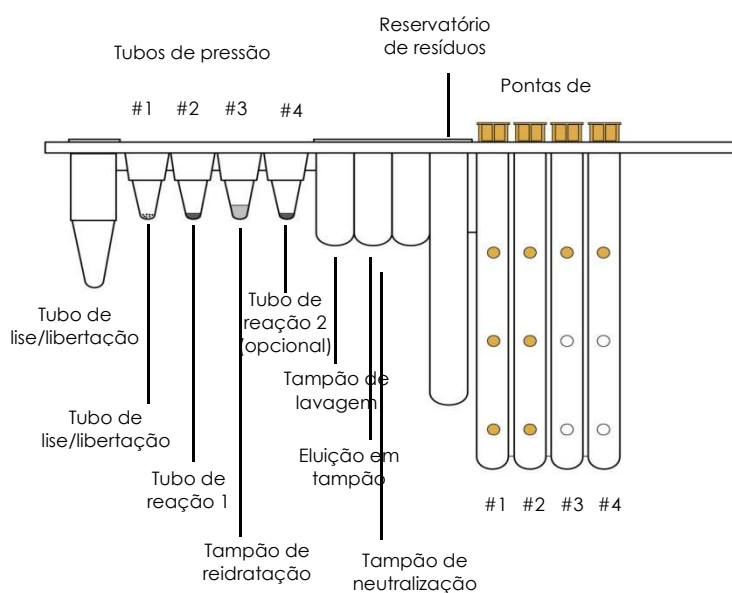


Figura 1 Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do kit de extração BD MAX™ ExK TNA-3.

8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" no ecrã "Run" utilizando o software v4.50A ou um superior do sistema BD MAX™.
- 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/o código de barras do tubo de tampão de amostra BD MAX™ ExK TNA-3 na janela "Sample tube" no separador "Work list", através da digitalização do código de barras com o leitor ou através da entrada manual.
- 5) Introduzir a identificação da amostra/doente na janela "Accession" do separador "Work list" (se aplicável) e clicar no botão "Save". Continue até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra. Certifique-se de que a identificação da amostra/doente e os tubos de tampão de amostra estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra preparado no(s) suporte(s) para tubos do sistema BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) para tubos no sistema BD MAX™ (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do sistema BD MAX™ e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de cartuchos de PCR BD MAX™ no sistema BD MAX™.
- 9) Fechar a porta do sistema BD MAX™.
- 10) Clicar em "Start Run" para iniciar o procedimento.

8.3.4 Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clique no botão "Results".
- 2) Fazer duplo clique no teste incluindo na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view".
- 3) Clicar no botão "Print", selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..."



- 4) Clicar no botão "Print or Export button" no ecrã "Run Reports"

9. Interpretação dos resultados

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

A análise dos dados é realizada com o software do sistema BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do sistema BD MAX™ proporciona 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 (ver a Tabela 2). 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 5.

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 sistema BD MAX™.

Com a ajuda da seguinte tabela, ler e analisar os resultados:

Influenza A (475/520)	Influenza B (585/630)	RSV (630/665)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
-	-	-	+	Influenza A, Influenza B e RSV Negativos
+	+	+	+/-	Influenza A, Influenza B e RSV Positivos
+	-	-	+/-	Influenza A Positivo, Influenza B e RSV Negativos
+	+	-	+/-	Influenza A e B Positivos, e RSV Negativo
+	-	+	+/-	Influenza A e RSV Positivos, e Influenza B Negativo
-	+	-	+/-	Influenza B Positivo, Influenza A e RSV Negativos
-	+	+	+/-	Influenza B e RSV Positivos, Influenza A Negativo
-	-	+	+/-	RSV Positivo, Influenza A e B Negativos
UNR	UNR	UNR	UNR	Resultado não resolvido (UNR) 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
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. 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 sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa

Tabela 5. Interpretação da amostra
+: curva de amplificação
-: sem curva de amplificação



Uma amostra é considerada positiva, se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno pode mostrar ou não um gráfico de amplificação, já que a presença de um elevado número inicial de cópias do ácido nucleico alvo pode causar uma amplificação preferencial desta última. Nestes casos, a deteção do controlo interno não é necessária.

Uma amostra é considerada negativa se não for detetada uma curva de amplificação acima do valor limiar, e o controlo interno a apresentar. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno.

Em caso de ausência do sinal de controlo interno nas amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio diluindo a amostra 1:10 ou repetir a extração para excluir possíveis problemas de inibição.

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 amostras de colheitas de exsudado faríngeo.
- O correto funcionamento do teste depende da qualidade da amostra; o RNA deve ser extraído de forma adequada das amostras respiratórias. Uma forma inadequada de colheita, armazenamento e/ou transporte das amostras pode dar origem a falsos negativos.
- Pode-se detetar um baixo número 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 Influenza A, Influenza B e/ou RSV, quer pelas amostras que contêm elevadas concentrações de RNA alvo quer pela contaminação por arraste a partir de produtos de PCR de reações anteriores.
- Os resultados obtidos com o kit de deteção em tempo real VIASURE Flu A, Flu B e RSV podem ser "Não resolvido" devido ao facto de a amostra conter inibidores ou reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada ou "Indeterminado" ou "Incompleto" devido a falha do instrumento e exige um novo teste.

11. Controlo de qualidade

VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reação que confirma o correto funcionamento da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

Foram avaliadas 344 amostras respiratórias (colheitas de exsudado faríngeo) de doentes sintomáticos utilizando o VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit. Estes resultados foram comparados com os obtidos por um método de deteção molecular (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Os resultados foram os seguintes:



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

Tabela 6. Avaliação comparativa dos resultados para Influenza A.

A percentagem de concordância positiva é >98% e a percentagem de concordância negativa é >96%.

*A baixa quantidade do RNA modelo detetado nestas amostras está abaixo do limite de deteção do método utilizado.

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

Tabela 7. Avaliação comparativa dos resultados para Influenza B.

A percentagem de concordância positiva é >96% e a percentagem de concordância negativa é >99%.

*A baixa quantidade do RNA modelo detetado nestas amostras está abaixo do limite de deteção do método utilizado.

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

Tabela 8. Avaliação comparativa dos resultados para RSV.

A percentagem de concordância positiva é >84% e a percentagem de concordância negativa é >99%.

*A baixa quantidade do RNA modelo detetado nestas amostras está abaixo do limite de deteção do método utilizado.

Os resultados mostram uma elevada sensibilidade e especificidade para detetar vírus Influenza A, Influenza B e RSV utilizando o VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit.



12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit tem um limite de detecção ≥ 10 cópias de RNA por reação para Influenza A, Influenza B e RSV (Figura 2, 3 e 4) com uma taxa de aceitação $\geq 95\%$

Figura 2 Diluições em série de um padrão de Influenza A (2×10^6 - 2×10^1 cópias/reação). Teste realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

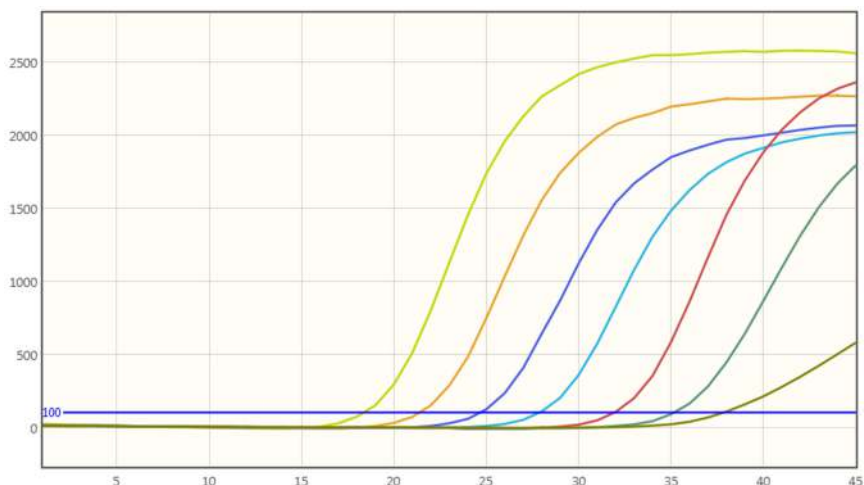


Figura 3 Diluições em série de um padrão de Influenza B (2×10^6 - 2×10^1 cópias/reação). Teste realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

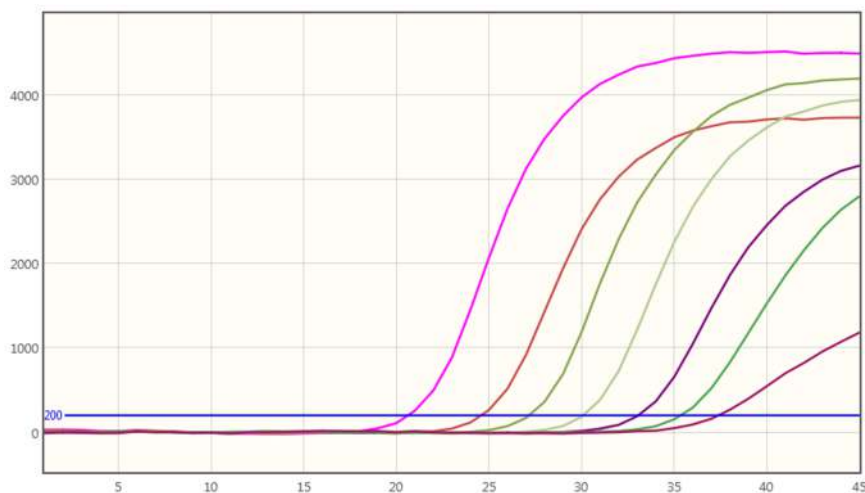
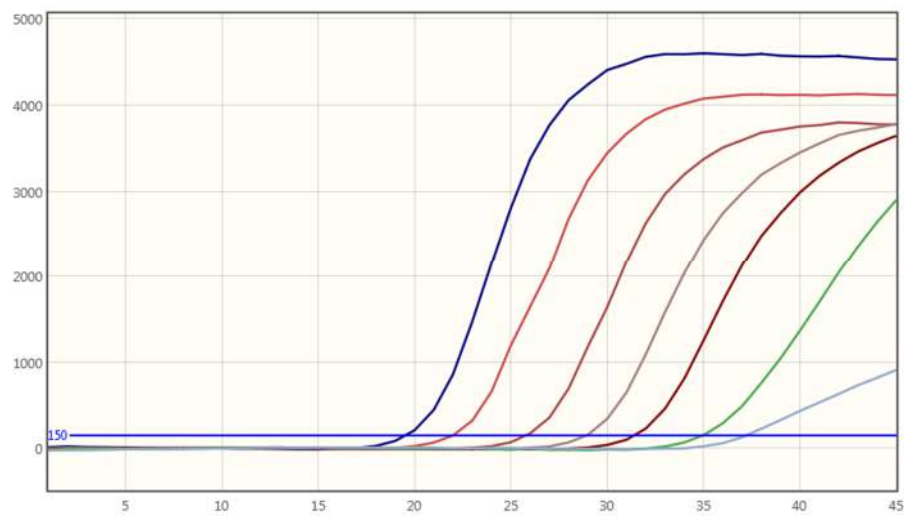


Figura 4 Diluições em série de um padrão de RSV (2×10^6 - 2×10^0 cópias/reação). Teste realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio de Influenza A, Influenza B e RSV foi confirmada testando um painel composto por diferentes micro-organismos que representam os agentes patogénicos respiratórios mais comuns.

Nenhuma reação cruzada foi detectada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados, exceto os patógenos alvo de cada ensaio:



Teste de reatividade cruzada					
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Human rhinovirus	-	A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Human Adenovirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+
<i>Legionella pneumophila</i>	-	MERS Coronavirus	-	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-/+	Influenza A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-/+	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/South Australia/55/2014	-/+
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C)	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Florida/04/06 virus	-/+
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+
Enterovirus Echovirus types 11 and 30	-	A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017	-/+
Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016	-/+
Human metapneumovirus A and B	-	A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV)	-/+
Human coronavirus 229E	-	A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+		

Tabela 9. Micro-organismos e agentes patogênicos de referência utilizados neste estudo.

12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection kit para Influenza A foi avaliada contra a estirpe derivada das estirpes: A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus, A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus, A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), A/South Australia/55/2014 e A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC-175C),



A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1) A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) e A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, mostrando um resultado positivo.

A reatividade do VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit para Influenza B foi avaliada contra a estirpe derivada das estirpes: B/Brisbane/60/2008-like virus (B/Victoria lineage), B/Florida/04/06 e B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage), B/Colorado/6/2017, B/Maryland/15/2016, mostrando um resultado positivo.

A reatividade do VIASURE *Flu A*, *Flu B* & RSV Real Time PCR Detection kit para RSV foi avaliada contra o Vírus Sincicial Respiratório (RSV A e B) humano, mostrando um resultado positivo.

13. 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. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Accessed 2015 Dec 30.
5. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
6. French, *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
7. X. Yu *et al.* Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
8. N. Mazur *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
9. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
10. A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
11. M. Hindiyeh *et al.* Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424.



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

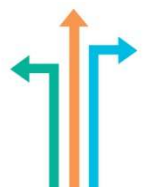
	<i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico In vitro		Keep dry Armazenar em local seco		Use by Data de validade		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização		Temperature limitation Limitação de temperatura		Contains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

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

BD MAX™ é uma marca registrada da Becton, Dickinson and Company









CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC