

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Respiratory Virus Mix I
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 Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444219 / VS-SFR124

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

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / O Kit contém as instruções de utilização (IDU) na versão em inglês/espanhol.

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

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

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

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

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

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

NO For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, følg instruksjonene for tilgang til språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, vennligst kontakt: viasure@certest.es.

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

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

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

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Contacte viasure@certest.es se o seu idioma não estiver na lista.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: O utilizador deve notificar o fabricante e as autoridades competentes do Estado-Membro no qual está estabelecido como utilizador e/ou paciente de qualquer incidente grave relacionado com o produto.

Content

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

Conteúdos

1.	Utilização prevista	21
2.	Introdução e explicação	21
3.	Princípio do procedimento	22
4.	Reagentes fornecidos	23
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	23
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	24
7.	Precauções para o utilizador.....	24
8.	Procedimento do teste	25
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	25
8.2.	Preparação da amostra e extração de ADN	26
8.3.	Protocolo de PCR.....	26

9.	Interpretação dos resultados.....	30
10.	Limitações do teste.....	32
11.	Controlo de qualidade	33
12.	Características do teste	33
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	33
12.2.	Sensibilidade analítica.....	34
12.3.	Especificidade analítica.....	36
12.4.	Reatividade analítica	36
	Bibliography/ Bibliografia	38
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	39
	Trademarks.....	39

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in respiratory samples (nasopharyngeal swabs) from patients suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) infection in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. 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 specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B).

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to Coronaviridae family. There are six coronavirus species known to cause human diseases. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV.

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2.

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever or chills, cough, fatigue, anorexia, myalgia and dyspnea. Less common symptoms are sore throat, nasal congestion, headache, diarrhea, nausea and vomiting. Loss of smell (anosmia) or loss of taste (ageusia) preceding the onset of respiratory symptoms has also been reported. Older adults and people who have severe underlying medical conditions like heart or lung disease or diabetes seem to be at higher risk for developing more serious complications from COVID-19 illness.

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) specimens collected mainly by a healthcare provider) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 and

other respiratory viruses, such as Influenza and RSV.

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 SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and RSV viruses.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in nasopharyngeal swabs. The detection is done in 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 *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 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 *Respiratory Virus Mix I* 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 and reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2	475/520	<i>N</i> and <i>ORF1ab</i> gene
Influenza B	530/565	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
Influenza A	585/630	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
RSV (A/B)	630/665	<i>N</i> gene
Endogenous Internal Control (EIC)	680/715	Human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	1K 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-SFR124 (444219).

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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 or 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- 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 care 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 Respiratory Virus Mix I 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 *Respiratory Virus Mix 1* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs collected in sterile Vircell® transport medium or in sterile Virus transport and preservation medium (Biocomma®), and in Universal Transport Medium, depending on the sample. 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 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), 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 72 hours 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 clinical samples 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>), 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) and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Sample preparation and DNA 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.

1. Pipette 400-750 µL of nasopharyngeal samples 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 Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE Respiratory Virus Mix I 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 Respiratory Virus Mix I.
- 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 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1K (concerning Respiratory Virus Mix I reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another 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 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

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	-	4.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	1.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	3.0	-	18.0	
	680/715	0.0	0.0	0.0	1.5	-	

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.

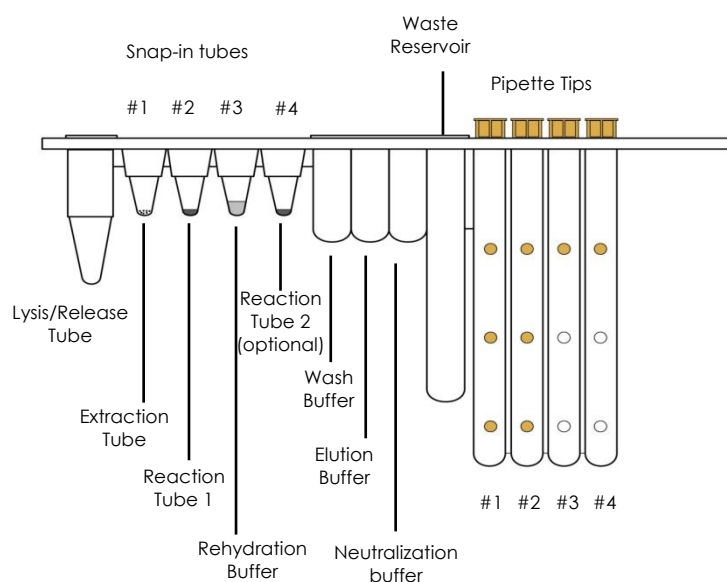
12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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.
- 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 color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of *Respiratory Virus Mix 1* reaction tubes (1K foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum 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 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 (11 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 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 *Respiratory Virus Mix 1* (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 analyze 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 that meets the setting criteria.
- 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 analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 (475/520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Endogenous Internal Control (680/715)	Interpretation
+	+	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA detected ¹
-	+	+	+	+/- ¹	Flu B, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2 RNA not detected ¹
+	-	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and Flu B RNA not detected ¹
+	+	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) RNA detected and Flu A RNA not detected ¹
+	+	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A RNA detected and RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	+	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B RNA detected and Flu A, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A RNA detected and Flu B, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA detected and Flu B, Flu A RNA not detected ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Flu B, Flu A RNA detected and SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA not detected ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Flu B, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu A RNA not detected ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu B RNA not detected ¹
+	-	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2 RNA detected ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Influenza B RNA detected ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Influenza A RNA detected ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RSV RNA detected ¹
-	-	-	-	+ ²	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) 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	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	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 Endogenous Internal Control (EIC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the EIC 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 endogenous internal control is positive (Ct less than 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 following the indications below.

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 PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

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 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 SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B), either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) used in VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- 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 RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection or cutoff for the assay.

- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19, gripe and RSV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable virus and does not imply that these virus are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of target viral sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of target *RNA* in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (EIC) 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with clinical suspicion of SARS-CoV-2, Flu A/B and or RSV A/B infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L. in collaboration with the Biobank of the Sistema de Salud de Aragón (BSSA) and the Microbiology and Parasitology Department of Hospital Universitario Central de Asturias	Nasopharyngeal swabs	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

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

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) or VIASURE SARS-CoV-2 Real time PCR Detection Kit, + subsequent whole genome sequencing	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0.977 (0.934-0.995)	0.998 (0.991-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test for use on the cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0.815-1)	1 (0.995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0.961 (0.865 – 0.995)	0.999 (0.992-1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0.929-1)	1 (0.995-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Result show agreement to detect SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (A/B) using VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detection limit (LoD) results on nasopharyngeal samples with a positive rate of $\geq 95\%$ are as follows:

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 5.01 IU (International Units)/ μl for SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 1.8×10^2 CEID₅₀ (Median Chicken Embryo Infectious Dose)/ml for Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) /ml for Influenza A.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 4 genome copies/ μl for RSVA and RSVB.

Note: The detection limit was calculated using a sample volume of 400 μl .

Examples of the amplification plots resulting from running an assay on the BD MAX™ System are shown below

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

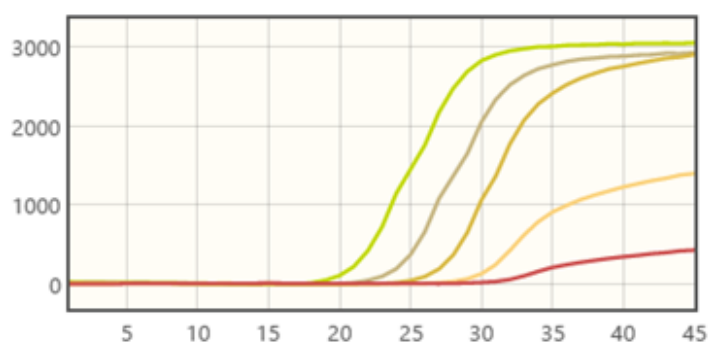


Figure 3. Dilution series of Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

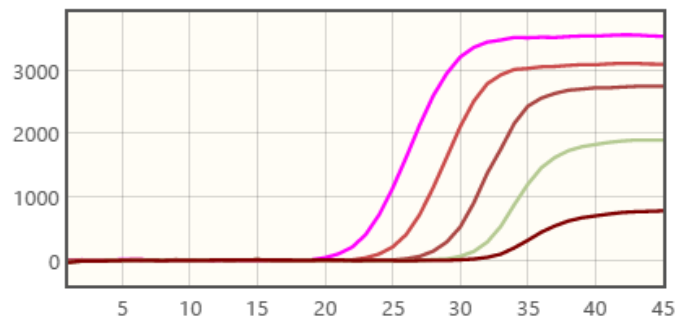


Figure 4. Dilution series of Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

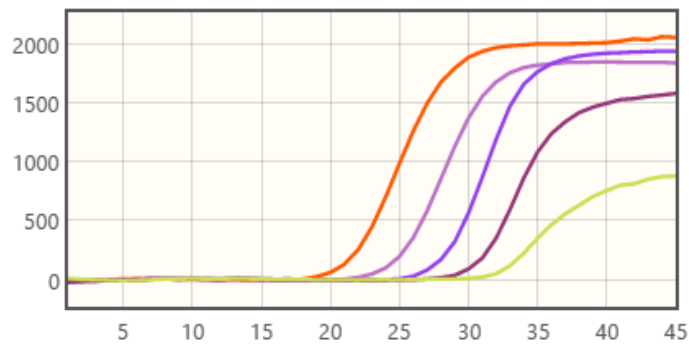


Figure 5. Dilution series of RSVA (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).

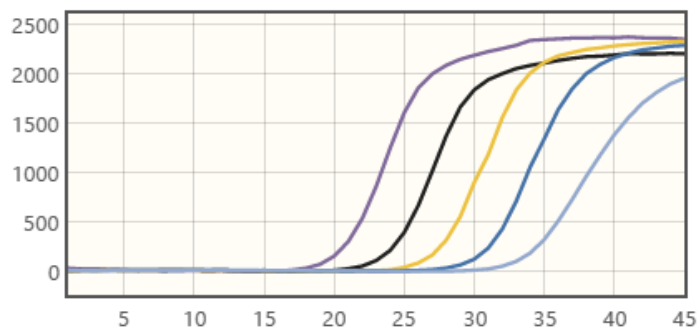
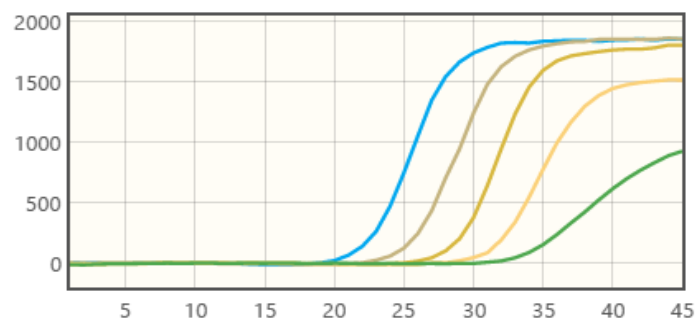


Figure 6. Dilution series of RSVB (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Respiratory Virus Mix I* 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:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Enterovirus 68, 71	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Human metapneumovirus A and B	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
MERS Coronavirus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **SARS-CoV-2** was evaluated against RNA extracted from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, synthetic RNA controls for MT007544.1 variant (SARSCoV2 isolate Australia/VIC01/2020), MN908947.3 variant (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), alpha variant (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), Beta variant (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), Gamma variant (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) and Kappa variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), and heat inactivated SARSCoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), and irradiated cell lysate from 2019-nCoV/USA-WA1/2020, and lyophilized cell lysates from BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 and BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza B** was evaluated against RNA extracted from the following strains: B/Phuket/3073/2013 virus, B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Florida/04/06 virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata Lineage), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Brisbane/3/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria Lineage), B/Victoria/304/2006 (Victoria Lineage) virus, B/Bangladesh/3333/2007 (Yamagata Lineage) virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza A** was evaluated against RNA extracted from the following strains: A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus,

A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09) virus, A/California/7/2009 (H1N1) virus, A/California/7/2009 (H1N1pdm09) virus, A/South Australia/55/2014 virus, Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175 virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B virus, Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) virus, Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147 virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148 virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173 virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A virus, A/Victoria/2570/2019 IVR-215 virus and A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224 virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **RSV** was evaluated against RNA extracted from Respiratory Syncytial Virus A (strain A-2) and Respiratory Syncytial Virus B (strain 9320), showing positive results.

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System consiste num teste de RT-PCR em tempo real automatizado para a deteção qualitativa de ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (tipos A e B) nas amostras respiratórias (zarcatoas nasofaríngeas) de pacientes com suspeita de infeção respiratória pelo profissional de saúde (PS). Este teste destina-se a ser utilizado como um auxílio na identificação de infeção por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (tipos A e B), em combinação com os sinais e sintomas clínicos do paciente e dos fatores de risco epidemiológicos. 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 amostras, e o ADN complementar (ADNc) é sintetizado e amplificado usando RT-pCR e detetado usando sondas de corante repórter fluorescente específicas para SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (tipos A e B).

2. Introdução e explicação

Os Coronavírus são vírus de ARN de sentido positivo, não segmentados, encapsulados e pertencem à família Coronaviridae. Existem seis espécies de coronavírus que se sabe causarem doenças em seres humanos. Quatro vírus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causam sintomas de constipação comum e os outros dois (coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus associado a síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV)) são zoonóticos e provocam complicações mais graves. O SARS-CoV e o MERS-CoV provocaram mais de 10.000 casos cumulativos nas últimas duas décadas, com taxas de mortalidade de 34% para o MERS-CoV e de 10% para o SARS-CoV.

Em dezembro de 2019, algumas pessoas que trabalhavam ou residiam nas redondezas do mercado de peixe de Huanan em Wuhan, Província de Hubei, apresentaram pneumonia de causa desconhecida. A análise profunda de sequenciação das amostras respiratórias indicou um novo coronavírus, o qual foi inicialmente designado em 2019 por novo coronavírus (2019-nCoV) e, mais tarde, por SARS-CoV-2.

A transmissão entre humanos do SARS-CoV-2 foi confirmada, mesmo no período de incubação sem sintomas, e o vírus provoca doença respiratória grave, como a causada pelo SARS-CoV. Embora a pneumonia seja a principal doença associada, alguns doentes desenvolveram pneumonia grave, edema pulmonar, síndrome de insuficiência respiratória aguda, ou falência de múltiplos órgãos e morte. Os Centros de Prevenção e Controlo de Doenças (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideram que os sintomas do SARS-CoV-2 podem surgir logo ao fim de 2 dias ou apenas ao fim de 14 dias após a exposição, sendo os mais frequentes febre ou arrepios, tosse, fadiga, anorexia, mialgia e dispneia. Dores de garganta, congestão nasal, cefaleias, diarreia, náuseas e vômitos constituem sintomas menos frequentes. Também foram relatados sintomas como perda de olfato (anosmia) ou perda de paladar (ageusia) que precedem o início dos sintomas respiratórios. Adultos mais velhos e pessoas com condições médicas preexistentes graves como doença cardíaca ou pulmonar, ou diabetes, parecem apresentar um risco mais elevado de desenvolver complicações mais graves da doença COVID-19.

O CDC recomenda amostras do trato respiratório superior (amostras de esfregaços nasofaríngeos (NP) e orofaríngeos (OP), esfregaço nasal turbinado médio, esfregaço nasal, lavagem/aspirado nasofaríngeo ou

lavagem/aspirado nasal (NW) colhidas sobretudo por um prestador de cuidados de saúde) e/ou amostras do trato respiratório inferior (expetoração, aspirado endotraqueal ou lavagem broncoalveolar em doentes com doença respiratória mais grave) para a identificação do SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios, como o Influenza e o VSR.

Os vírus Influenza pertencem à família Orthomyxoviridae e são causadores da maior parte das infeções do aparelho respiratório inferior de origem vírica. 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 A e B sinciciais respiratórios humanos (RSV) pertencem à família Paramyxoviridae e são os agentes víricos mais importantes no desenvolvimento 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 SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e VSR.

3. Princípio do procedimento

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a deteção qualitativa de ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (tipos A e B) em zaragatoas nasofaríngeas. A deteção realiza-se através de um formato RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. O alvo de ARN isolado é transcrito gerando ADN complementar pela transcriptase reversa, sendo seguido da amplificação de uma região conservada dos genes *N* e *ORF1ab* do SARS-CoV-2, gene *M1* de Influenza B, gene *M1* de Influenza A e gene *N* de RSV (tipos A e B) usando primers específicos e uma sonda com marcação fluorescente.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da 5' exonuclease da DNA polimerase. 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.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para o ensaio de PCR em tempo real (primers/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase e transcriptase reversa) num formato estabilizado, bem como um controlo interno endógeno para a monitorização do processo de extração e/ou inibição da atividade da polimerase. O ensaio usa um gene de manutenção humano como um Controlo Interno Endógeno (CIE) (gene *RNase P* humano). Os genes de manutenção humanos estão envolvidos na manutenção celular básica e, por conseguinte, espera-se que estejam presentes em todas as células humanas nucleadas e mantenham níveis de expressão relativamente constantes.

Alvo	Canal	Gene
SARS-CoV-2	475/520	Genes <i>N</i> e <i>ORF1ab</i>
Influenza B	530/565	Gene <i>Matriz (M1)</i>
Influenza A	585/630	Gene <i>Matriz (M1)</i>
RSV (A/B)	630/665	Gene <i>N</i>
Controlo interno endógeno (EIC)	680/715	Gene <i>RNase P</i> humano

Tabela 10. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno endógeno em formato estabilizado	Folha 1K	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 11. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com Cat.

Ref.º VS-SFR124 (444219).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A lista seguinte inclui os materiais e o equipamento que são necessários para a utilização mas não vêm fornecidos no VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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:442828 ou 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtice.

- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Água sem nuclease
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis 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 de saúde e técnicos de laboratório, 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.
- Nos casos em que sejam realizados outros testes de PCR na mesma área geral do laboratório, deve proceder com cuidado para garantir que o VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 e quaisquer reagentes adicionais requeridos para o teste 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 detecção. 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em zaragatoas nasofaríngeas colhidas em meio de transporte Vircell® esterilizado ou em meio de transporte e conservação de vírus esterilizado (Biocomma®), e em meio de transporte universal, dependendo da amostra em questão. 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 a 2 a 8°C durante até 72 horas, seguindo os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração (mais de 72 horas), é recomendado o envio a uma temperatura ≤ -20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2 e 8°C durante até 72

horas ou congeladas a -20°C ou idealmente -70°C , para a sua conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

As amostras clínicas têm de ser colhidas, transportadas e armazenadas de acordo com diretrizes laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), 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) and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Preparação da amostra e extração de ADN

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.

1. Pipete 400-750 μL de esfregaços nasofaríngeos para um tubo com tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 e feche o tubo com uma tampa septada. 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. Criação de um programa de teste de PCR para o VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Caso já tenha criado o teste para o VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode saltar 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 Informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), dê um nome ao seu teste: ou seja, VIASURE Respiratory Virus Mix I.
- 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 usado em combinação com um VIASURE for BD MAX test adicional, em seguida, selecione "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM com tampão de reidratação (tipo 5)).

- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Caso seja executado o software versão 5.00 ou mais recente e tenha lido o código de barras de tubos de encaixe de folha, no separador "Custom Barcodes" (Códigos de barras personalizados) selecione a configuração seguinte:
- "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1K (tubo de reação com *Respiratory Virus Mix I* reaction tube correspondente).
 - "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 do encaixe 4): outro tubo de reação (folha diferente), se optar por usar o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dual Master Mix Concentrated Lyophilized 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 usado em combinação com um teste VIASURE for BD MAX™ adicional, e deve efetuar os passos de definições e teste da PCR para as posições de encaixe 2 (verde) e encaixe 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tabela 12. "PCR settings" (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 recetor falso)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	475/520	-	4,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	1,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	3,0	-	18,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	1,5	-	

Tabela 13. Parâmetros de "Spectral Cross Talk" (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 14. Protocolo de PCR.

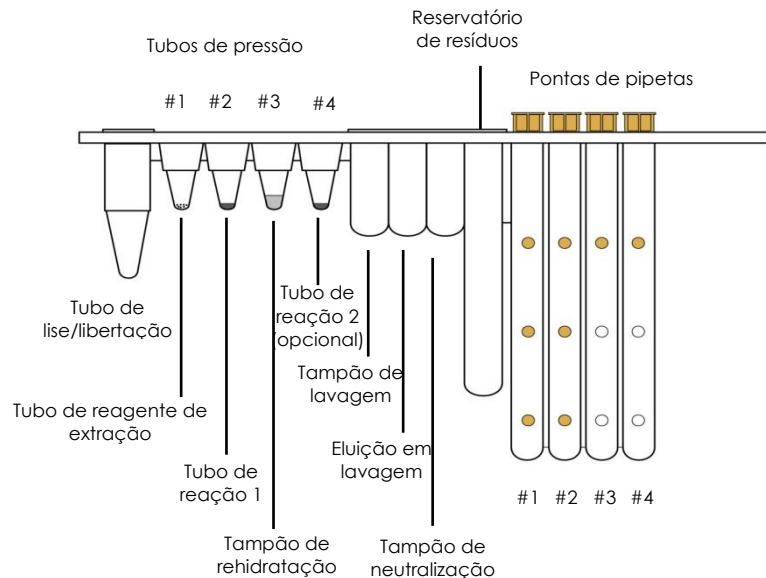
12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

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

- 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 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) Determine e separe o número apropriado de tubos de reação *Respiratory Virus Mix I* reaction tube (folha 1K) e encaixe-os nas posições correspondentes na tira (posição de encaixe 2, código de cor verde no rack. 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 (selo 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 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. Tiras de reagente individuais 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 pendente "Test" (Teste), selecione *VIASURE Respiratory Virus Mix I* (se ainda não estiver criado, consulte 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.

- O valor de Ct de -1 indica que não ocorreu um processo de amplificação que satisfaz os critérios definidos.

- 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:

SARS-CoV-2 (475/520)	Influenza B (530/565)	Influenza A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Controlo interno endógeno (680/715)	Interpretação
+	+	+	+	+/-1	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) ¹
-	+	+	+	+/-1	Foi detetado ARN de Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) e não foi detetado ARN de SARS-CoV-2 ¹
+	-	+	+	+/-1	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza A e RSV (A/B) e não foi detetado ARN de Influenza B ¹
+	+	-	+	+/-1	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, RSV (A/B) e não foi detetado ARN de Influenza A ¹
+	+	+	-	+/-1	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e não foi detetado ARN de RSV (A/B) ¹
+	+	-	-	+/-1	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, e não foi detetado ARN de Influenza A, RSV (A/B) ¹

+	-	+	-	+/- ¹	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza A, e não foi detetado ARN de Influenza B, RSV (A/B) ¹
+	-	-	+	+/- ¹	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2, RSV (A/B) e não foi detetado ARN de Influenza B, Influenza A ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Foi detetado ARN de Influenza B, Influenza A e não foi detetado ARN de SARS-CoV-2, RSV (A/B) ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Foi detetado ARN de Influenza B, RSV (A/B) e não foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza A ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Foi detetado ARN de Influenza A e RSV (A/B) e não foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B ¹
+	-	-	-	+/- ¹	Foi detetado ARN de SARS-CoV-2 ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Foi detetado ARN de Influenza B ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Foi detetado ARN de Influenza A ¹
-	-	-	+	+/- ¹	Foi detetado ARN de RSV ¹
-	-	-	-	+ ²	Não foi detetado ARN de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) 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	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a uma falha do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	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 15. 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 endógeno (CIE) pode ou não mostrar um sinal de amplificação. Por vezes, não é necessário detetar o CIE pois um número de cópias elevado do alvo pode provocar a amplificação preferencial dos ácidos nucleicos específicos do alvo.

2 Uma amostra é considerada negativa se a amostra não mostrar um sinal de amplificação no sistema de deteção, mas o controlo interno endógeno for positivo (Ct inferior a 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 seguindo as indicações abaixo.

Em caso de um resultado ambíguo contínuo, é recomendável reler as instruções de utilização, o processo de extração usado pelo utilizador; para verificar o desempenho correto de cada passo da PCR e rever os parâmetros e para verificar a forma sigmoideia da curva e a intensidade da fluorescência.

NOTA: Poderão ser testadas novas amostras na mesma sequência com amostras repetidas.

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.
- Embora este ensaio possa ser usado com outros tipos de amostras, foi validado com zaragatoas nasofaríngeas.
- 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 cônico, não homogênea, 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.
- Subsiste a possibilidade de resultados falsos positivos devido a reações cruzadas por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ou RSV (A/B), quer seja por amostras que contenham concentrações elevadas de ARN do alvo ou contaminação decorrente dos produtos da PCR de reações anteriores.
- As combinações de primer e sonda específicas para a deteção dos genes *N* e *ORF1ab* do SARS-CoV-2, *gene M1* de Influenza B, *gene M1* de Influenza A e *gene N* de RSV (tipos A e B) usados no VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System não mostram homologias combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana ou outros microrganismos respiratórios, o que pode dar origem a falsos positivos previsíveis.
- 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).
 - A degradação do ARN durante a expedição/armazenamento e/ou o processamento da amostra.
 - Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do primer ou sonda podem afetar a deteção de estirpes novas ou desconhecidas de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B).
 - Níveis do organismo na amostra abaixo do limite de deteção ou do valor limite para o ensaio.
 - A presença de inibidores de qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. O impacto das vacinas, das terapêuticas antirretrovirais, dos antibióticos, dos fármacos de quimioterapia ou imunossupressores usado para prevenir a COVID-19, a gripe e RSV ou usados durante o tratamento da infeção ainda não foi avaliado.
 - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- Algumas amostras podem não conseguir exibir curvas de amplificação de *RNase P* devido a um número baixo de células humanas na amostra clínica original. Um sinal de CI negativo não exclui a presença de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ou RSV (A/B) numa amostra clínica.

- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de vírus viável e não implica que estes vírus sejam infecciosos ou agentes causadores de sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo é indicativo da presença de sequências víricas do alvo.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica e informações epidemiológicas do paciente forem sugestivas de infecção por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ou RSV (A/B), deve ser ponderado um resultado falso negativo e debater testar novamente o mesmo.
- Um resultado negativo não exclui a presença de ARN do alvo numa amostra clínica. Se as observações clínicas, a história do paciente e as informações epidemiológicas forem sugestivas de infecção por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ou RSV (A/B), deverá ser ponderado um novo teste aumentando o volume da amostra.
- Caso se obtenha um resultado Não resolvido, Indeterminado ou Incompleto usando o VIASURE *Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System*, é necessário voltar a testar. Resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra, ou 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 *Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System* contém um controlo interno endógeno (CIE) em cada tubo de reação, que confirma a aplicação correta da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE *Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System* foi testado usando amostras clínicas (zaragatoas nasofaríngeas) de pacientes com suspeita clínica de infecção por SARS-CoV-2, Gripe A/B e/ou RSV A/B. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	CerTest Biotec S.L. em colaboração com o Biobank do Sistema de Salud de Aragón (BSSA) e o Microbiology and Parasitology Department of Hospital Universitario Central de Asturias	Zaragatoas nasofaríngeas	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Tabela 16. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, os valores positivos e negativos falsos, a sensibilidade e a especificidade do VIASURE *Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System* foram calculados em relação a cada ensaio comparativo, conforme mostrado na tabela seguinte:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) ou VIASURE SARS-CoV-2 Real time PCR Detection Kit, + sequenciação do genoma inteiro posterior	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0,977 (0,934-0,995)	0,998 (0,991- 1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test para utilização com o cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0,815- 1)	1 (0,995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0,961 (0,865 – 0,995)	0,999 (0,992- 1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0,929- 1)	1 (0,995-1)

Tabela 17. Os TP (valores positivos) e TN (negativos verdadeiros), os FP (valores positivos) e FN (negativos falsos), a sensibilidade e a especificidade do VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

O resultado demonstrou concordância para a deteção de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A e RSV (A/B) usando o VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

Os resultados do limite de deteção (LdD) do VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nas amostras nasofaríngeas com um taxa positiva de $\geq 95\%$ são os seguintes:

- O VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possui um limite de deteção (LdD) de 5,01 UI (Unidades Internacionais)/ μl para o SARS-CoV-2.
- O VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possui um limite de deteção (LdD) de $1,8 \times 10^2$ CEID₅₀ (dose infecciosa média de embriões de galinha)/ml para Influenza B.
- O VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possui um limite de deteção (LdD) de $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (dose infecciosa média de cultura de tecido) /ml para Influenza A.
- O VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System possui um limite de deteção de 4 cópias genómicas/ μl para o RSVA e o RSVB.

Nota: O limite de deteção foi calculado usando um volume de amostra de 400 μl .

São mostrados abaixo exemplos de gráficos de amplificação resultantes da execução de uma amostra no BD MAX™ System

Figura 2. Modelo de série de diluição de SARS-CoV-2 (5×10^5 - 5×10^0 cópias por reação) executado no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

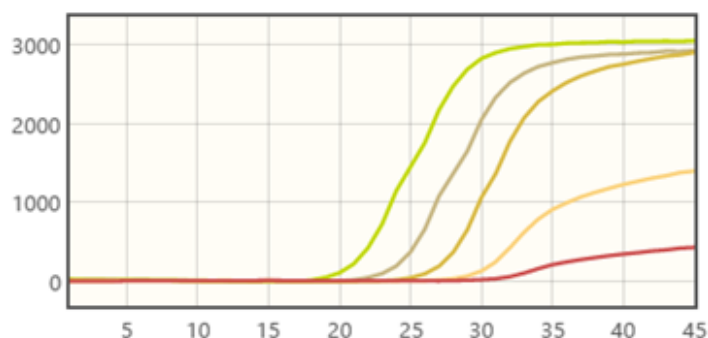


Figura 3. Modelo de série de diluição de Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 cópias por reação) executado no BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

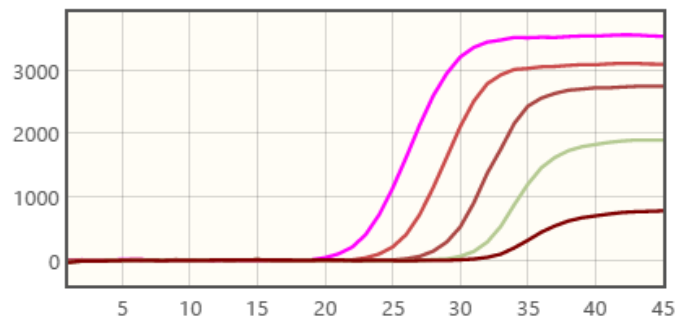


Figura 4. Modelo de série de diluição de Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 cópias por reação) executado no BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

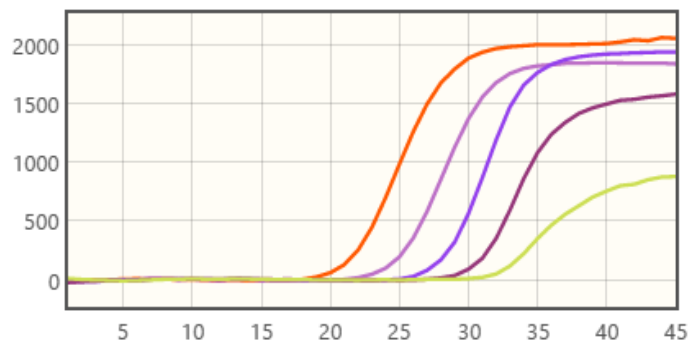


Figura 5. Modelo de série de diluição de RSVA (5×10^5 - 5×10^0 cópias genômicas por reação) executado no BD MAX™ System (canal 630/665 (CY5)).

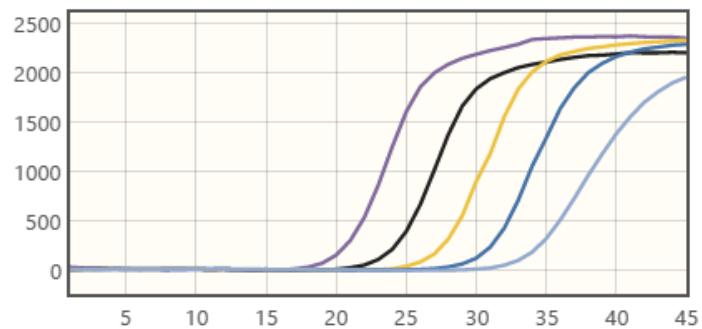
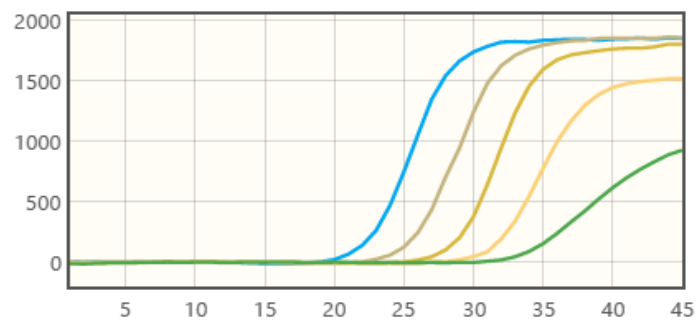


Figura 6. Modelo de série de diluição de RSVB (5×10^5 - 5×10^0 cópias genômicas por reação) executado no BD MAX™ System (canal 630/665 (CY5)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio de *Respiratory Virus Mix I* foi confirmada através do teste de um painel contendo diferentes microrganismos que representam os agentes patogênicos respiratórios mais comuns. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Enterovírus Coxsackievirus A24, A9 e B3	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Bocavirus	-	Enterovírus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Enterovírus 68, 71	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 e g885652	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Rinovírus humano	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i> CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Metapneumovírus A e B humano	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Coronavírus MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

Tabela 18. Microrganismos patogênicos de referência utilizados neste estudo.

12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para o **SARS-CoV-2** foi calculada comparativamente com ARN extraído de estirpe de 2019-nCoV humana BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, estirpe de 2019-nCoV humano 2019-nCoV/Italy-INMI1, controles de ARN sintéticos para a variante MT007544.1 (isolado de SARSCoV2 Australia/VIC01/2020), variante MN908947.3 (isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1), variante alfa (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), variante Beta (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), variante gama (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) e variante kappa (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), e estirpe de SARSCoV-2 terminativa 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), e lisado celular irradiado de 2019-nCoV/USA-WA1/2020, e lisados celulares liofilizados de BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 e BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, demonstrando resultados positivos.

A reatividade do VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza B** foi avaliada comparativamente com ARN extraído das estirpes seguintes: Vírus B/Phuket/3073/2013, vírus B/Brisbane/60/2008, vírus Influenza B/Florida/04/06, vírus B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata Lineage), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata Lineage), vírus B/Brisbane/3/2007 (Yamagata Lineage) B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria Lineage), vírus B/Victoria/304/2006 (Victoria Lineage), vírus B/Bangladesh/3333/2007 (Yamagata Lineage), demonstrando resultados positivos.

A reatividade do VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza A** foi avaliada comparativamente com ARN extraído das estirpes seguintes: Vírus A/Switzerland/9715293/2013

(H3N2), vírus A/Thüringen/5/2017 (H3N2), vírus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8), vírus A/Anhui/1/2013 (H7N9), vírus A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09), vírus A/California/7/2009 (H1N1), vírus A/California/7/2009 (H1N1pdm09), vírus A/South Australia/55/2014, vírus Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175, vírus A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180, vírus A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B, vírus Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1), vírus A/Brisbane/59/2007 (H1N1), vírus A/South Dakota/6/2007 (H1N1), vírus A/Hawaii/31/2007 (H1N1), vírus A/Qatar/1123/2007 (H1N1), vírus A/Cambodia/0371/2007 (H1N1), vírus Influenza A, vírus A/Brisbane/10/2007 (H3N2), vírus Influenza A, vírus A/Taiwan/760/2007 (H3N2), vírus Influenza A, vírus A/Texas/71/2007 (H3N2), vírus A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147, vírus A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148, vírus A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173, vírus A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, vírus A/California/08/2009 (H1N1)pdm09, vírus A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09, vírus A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09, vírus A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A, vírus A/Victoria/2570/2019 IVR-215 e vírus A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224, demonstrando resultados positivos.











A reatividade de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **RSV** foi avaliada comparativamente com ARN extraído do vírus sincicial respiratório A (estirpe A-2) e do vírus sincicial respiratório B (estirpe 9320), demonstrando resultados positivos.

Bibliography/ Bibliografia

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1>
4. Chen N. et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>
7. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html>
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
12. Yan Y et al. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primerprobes.pdf>
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
18. McBride R. et al. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. et al. Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.

20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testingstrategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>
21. G. Neumann et al. Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
22. 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.
23. 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.
24. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available from: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/
25. S. Subhash Bawage et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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>Unique Device Identification Identificação única de dispositivo</p>	 <p>Catalognumber 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.	25/07/2022
01	"Spectral Cross Talk" values of table 4 have been updated / Os valores de "Spectral Cross Talk" da tabela 4 foram actualizados	02/08/2022

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

Revision: 02nd August 2022.

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 rev02