

## RIDA® GENE Flu & RSV

**REF** PG0545



## 1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico in-vitro. O teste RIDA®GENE Flu & RSV, realizado no Roche LightCycler® 480II, é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação de RNA do vírus influenza (influenza A e influenza B) e RNA do vírus sincicial respiratório (RSV A e B) em esfregaços nasais e da garganta de humanos e lavado broncoalveolar (BAL) de pessoas com sinais e sintomas de infecção respiratória aguda.

O teste RIDA®GENE Flu & RSV se destina a apoiar o diagnóstico diferencial de infecções causadas por vírus influenza (influenza A e influenza B) e vírus sinciciais respiratórios (RSV A e B) em pacientes com sintomas de infecção respiratória em conexão com outros achados clínicos e laboratoriais.

Os resultados negativos não excluem a infecção por vírus influenza (influenza A, influenza B) ou vírus sincicial respiratório (RSV A e B) e não devem ser usados como única base para o diagnóstico. O produto é destinado ao uso por profissionais que trabalham em laboratórios hospitalares, laboratórios de referência, laboratórios particulares ou laboratórios públicos.

## 2. Sumário e explicação do teste

Também chamada de gripe, a influenza é uma das doenças respiratórias infecciosas mais significativas e é causada pelos vírus influenza.

Em todo o mundo, três a cinco milhões de pessoas contraem gripe todos os anos e, aproximadamente, entre 290.000 a 650.000 pessoas morrem da doença. As epidemias anuais de influenza podem ter grandes impactos no sistema de saúde e na economia.<sup>1</sup>

Na temporada 2018/19, as estimativas colocam o número de consultas médicas relacionadas à influenza na Alemanha em cerca de 3,8 milhões. O número de hospitalizações relacionadas à influenza de estabelecimentos de primeiro atendimento foi estimado em 18.000 casos.<sup>2</sup>

O Grupo de Trabalho sobre Influenza (AGI) do Instituto Robert Koch estima que haja entre um e sete milhões de consultas médicas relacionadas à influenza a cada ano. Durante uma onda severa de gripe, como na temporada 2012/2013, houve cerca de 30.000 hospitalizações relacionadas à influenza e 20.000 mortes. Em contraste, em estações amenas (como 2013/14) apresentam apenas 3.000 hospitalizações estimadas, e o excesso de mortalidade associado à influenza não é detectado.<sup>3</sup>

Os vírus influenza são vírus de RNA pertencentes à família Orthomyxoviridae e são divididos nos subtipos A, B e C. A característica dos vírus influenza é sua alta variabilidade dos antígenos de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) devido a mutações (variação antigênica). Os tipos de influenza A e B causam as epidemias de gripe anuais, enquanto as infecções pelo vírus influenza C causam apenas doenças leves.

Epidemiologicamente, os vírus influenza A são os mais importantes devido à sua diversidade: são os responsáveis por três pandemias no século XX, bem como pela

maioria das epidemias de gripe. A maior parte das infecções de influenza do tipo A nos seres humanos são causadas pelos subtipos H1N1 e H3N2. Além da variação antigênica resultante da mutação, a mistura de uma cepa de influenza A humana e não humana pode criar novos subtipos de influenza A (variação antigênica), que pode desencadear uma pandemia. O subtipo A de influenza H1N1 está associado às últimas e potenciais novas epidemias de gripe (por exemplo, a Gripe Espanhola em 1918/19 e a Gripe Suína 2009). Atualmente, este subtipo de influenza A é chamado de H1N1v. Os vírus influenza são transmitidos por gotículas e aerossóis. O período de incubação é de um a quatro dias. Os sintomas clínicos são graves, principalmente doenças do trato respiratório acompanhadas de tosse e febre alta. É característico o início súbito dos sintomas. No curso de doenças graves, podem ocorrer pneumonias e superinfecções bacterianas, que podem ser fatais, especialmente para idosos e crianças.<sup>4</sup>

Os vírus sinciciais respiratórios (RSV) pertencem à família *Pneumoviridae* e são vírus de RNA de fita simples (ssRNA) envelopados. Circulam dois grupos de RSV: A e B, enquanto o RSV A é predominante na maioria dos anos.<sup>5</sup>

O RSV é um patógeno global amplamente difundido e pode causar doenças do trato respiratório superior e inferior em qualquer idade da vida. Em bebês, principalmente bebês prematuros e crianças pequenas, o RSV é um dos patógenos mais importantes das infecções do trato respiratório.<sup>5</sup> O RSV é transmitido por contato ou infecção por gotículas e se manifesta com sintomas como rinite, resfriado, tosse, bronquite aguda e até infecção do ouvido médio. Um curso agudo pode ocorrer se uma superinfecção bacteriana estiver presente.<sup>6</sup> Crianças e bebês geralmente apresentam um quadro sério do caso que requer hospitalização. Os sintomas incluem febre, congestão nasal e taquipnéia. Estimativas colocam a incidência de infecções por RSV em todo o mundo em 48,5 casos e 5,6 casos graves em cada 1.000 crianças no primeiro ano de vida. Embora 50 a 70% dos bebês e crianças pequenas tenham uma infecção por RSV no primeiro ano de vida, quase 100% tiveram uma após o segundo ano de vida.<sup>5</sup>

### 3. Princípio do teste

O teste RIDA®GENE Flu & RSV é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação de RNA do vírus influenza (influenza A e influenza B) e RNA do vírus sincicial respiratório (RSV A e B) em esfregaços nasais e da garganta de humanos e lavado broncoalveolar (BAL) (Consulte a seção 9.4). A detecção é feita em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa: transcrição reversa (RT) e PCR subsequente ocorrem em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado é transcrito para o cDNA com a ajuda de uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos para influenza A, influenza B e RSV (influenza A/B: Gene M e gene NP1; RSV: Gene F) são então amplificados usando PCR em tempo real. As sequências de alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o

fragmento amplificado na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a **Taq-Polymerase** separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Flu & RSV contém **Internal Control RNA** (ICR) para ser capaz de controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial de inibição de PCR.

#### 4. Reagentes fornecidos

**Tabela 1:** Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	Amarelo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	Vermelho
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	Castanho
N	No Template Control	1x	450 µl	Branca
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

#### 5. Instruções de armazenamento

- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C a 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 °C a 8 °C).

## 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Flu & RSV foi verificado usando a seguinte combinação da plataforma de extração e instrumento de PCR em tempo real:

**Tabela 2a:** Equipamento necessário (verificado)

Tampão de extração	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivos PCR em tempo real	
Roche	LightCycler® 480II

Além disso, o teste de RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Flu & RSV é compatível com o uso com a seguinte plataforma de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

**Tabela 2:** Equipamento necessário (compatível)

Tampão de extração	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Dispositivos PCR em tempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota:** Ao usar o Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilize apenas tubos de ensaio de 0,1 ml.

Se tiver que usar outros procedimentos de extração ou dispositivos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm para verificar a compatibilidade em [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- Sistema de coleta de esfregaço esterilizado (por exemplo, meio eSwab® Amies, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) ao usar o LightCycler® 480II
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos de ensaio, filmes)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Vortexer
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1,000 µl)
- Pontas de pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (livre de nuclease)

## 7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Apenas para diagnóstico *in vitro*.

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- Sempre cumpra estritamente as instruções de uso para a realização desse teste.
- Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.
- Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.
- Garanta que a extração, a preparação da PCR e a PCR sejam realizadas em salas diferentes, a fim de evitar contaminações cruzadas.
- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Descarte o kit de teste assim que o prazo de validade expirar.
- Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Coleta e armazenamento de amostra

### 8.1 Preparação de RNA de esfregaços nasais e da garganta

Um kit de extração de ácido nucleico disponível no mercado (por exemplo, RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de ácido nucleico (por exemplo, Maxwell® RSC (Promega)) é recomendado para a preparação de RNA a partir de esfregaços nasais e da garganta. As instruções do fabricante devem ser observadas.

Recomendamos que use a quantidade de meio especificada pelo fabricante na extração de ácido nucléico do kit de extração de ácido nucléico, ou o sistema de extração de ácido nucléico, e que siga as instruções do fabricante. O teste RIDA®GENE Flu & RSV contém um **Internal Control RNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4)

Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, durante o procedimento de extração, devem ser usados 20 µl do **Internal Control RNA** para cada amostra. O **Internal Control RNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Recomendamos adicionar 1 µl para cada reação do **Internal Control RNA** à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

## 8.2 Preparação de RNA de BAL

Um kit de extração de ácido nucleico disponível no mercado (por exemplo, RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração de ácido nucleico (por exemplo, Maxwell® RSC (Promega)) é recomendado para a preparação de RNA a partir de BAL. As instruções do fabricante devem ser observadas.

Recomendamos que use a quantidade de meio especificada pelo fabricante na extração de ácido nucléico do kit de extração de ácido nucléico, ou o sistema de extração de ácido nucléico, e que siga as instruções do fabricante. O teste RIDA®GENE Flu & RSV contém um **Internal Control RNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4) Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, durante o procedimento de extração, devem ser usados 20 µl do **Internal Control RNA** para cada amostra. O **Internal Control RNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Recomendamos adicionar 1 µl para cada reação do **Internal Control RNA** à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

## 9. Realização do teste

### 9.1 Preparação da mistura principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendável adicionar um volume adicional de 10% à mistura principal para equilibrar a perda de pipeta (consulte a Tabela 3, Tabela 4). Antes de usar, descongele a **Reaction Mix**, a **Enzyme Mix**, o **Positive Control**, o **No Template Control**, e o **Internal Control RNA**, misture bem (exceto a mistura de enzimas) e centrifugue por um curto período de tempo. Sempre resfrie os reagentes adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C a 8 °C).

**Tabela 3:** Exemplo de cálculo e preparação da mistura principal para dez (10) reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

**Tabela 4:** Exemplo do cálculo e produção da mistura principal para dez (10) reações (ICR apenas como controle de inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10%)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

## 9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (frasco/placa).

**Controle negativo:** Pipete 5 µl de **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle negativo.

**Amostras:** Adicione 5 µl de eluato à mistura principal pré-pipetada.

**Controle positivo:** Adicione 5 µl de **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

**Nota:** Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle positivo.

Selar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o dispositivo de PCR em tempo real. Inicie a PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (consulte a Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8).

## 9.3 Configuração do instrumento de PCR

### 9.3.1 Perfil de RT-PCR em tempo real universal

**Tabela 5:** Perfil de RT-PCR em tempo real universal para a LightCycler® series e RIDA®CYCLER

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Tabela 6:** Perfil de RT-PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

**Nota:** O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

**Nota:** O perfil de PCR em tempo real universal também pode ser utilizado em testes de DNA se houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA em uma execução.

## 9.4 Configuração do canal de detecção

Tabela 7: Seleção dos canais de detecção adequados

Dispositivo de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	RSV A/B	Verde	-
	ICR	Amarelo	
	Influenza B	Laranja	
	Influenza A	Vermelho	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	RSV A/B	465/510	<b>É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).</b>
	ICR	533/580	
	Influenza B	533/610	
	Influenza A	618/660	
<b>Agilent Technologies Mx3005P</b>	RSV A/B	FAM	<b>Defina o corante de referência como nenhum.</b>
	ICR	HEX	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>ABI 7500 Fast Dx</b>	RSV A/B	FAM	<b>Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.</b>
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	RSV A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Influenza B	ROX	
	Influenza A	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	RSV A/B	Verde	<b>As configurações de ganho devem ser definidas como 5 (padrão de fábrica) para todos os canais.</b>
	ICR	Amarelo	
	Influenza B	Laranja	
	Influenza A	Vermelho	

## 10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do respectivo dispositivo de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 8, Fig. 1, Fig. 2 e Fig. 3).

O **Positive Control** vem em uma concentração de  $10^3$  cópias/ $\mu$ l. É usado em uma quantidade total de  $5 \times 10^3$  cópias em cada execução de PCR.

**Tabela 8:** Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	Não detectável

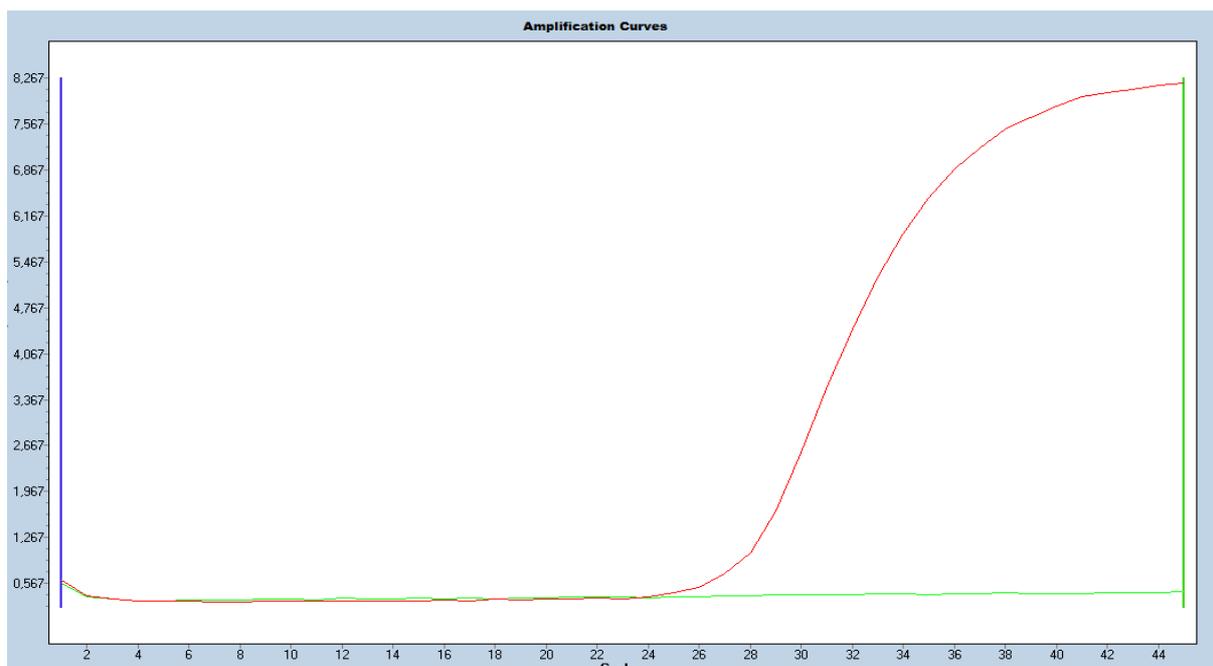
*\*1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.*

Se o controle positivo não estiver dentro da faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

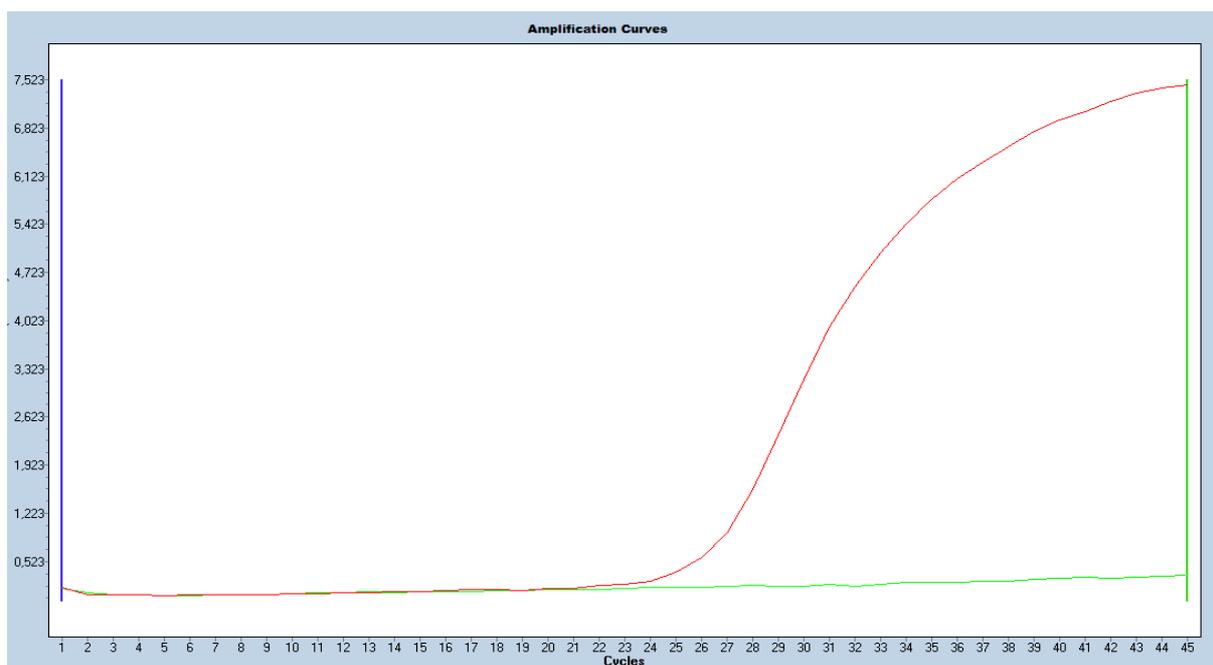
Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações precisam ser reanalisadas, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

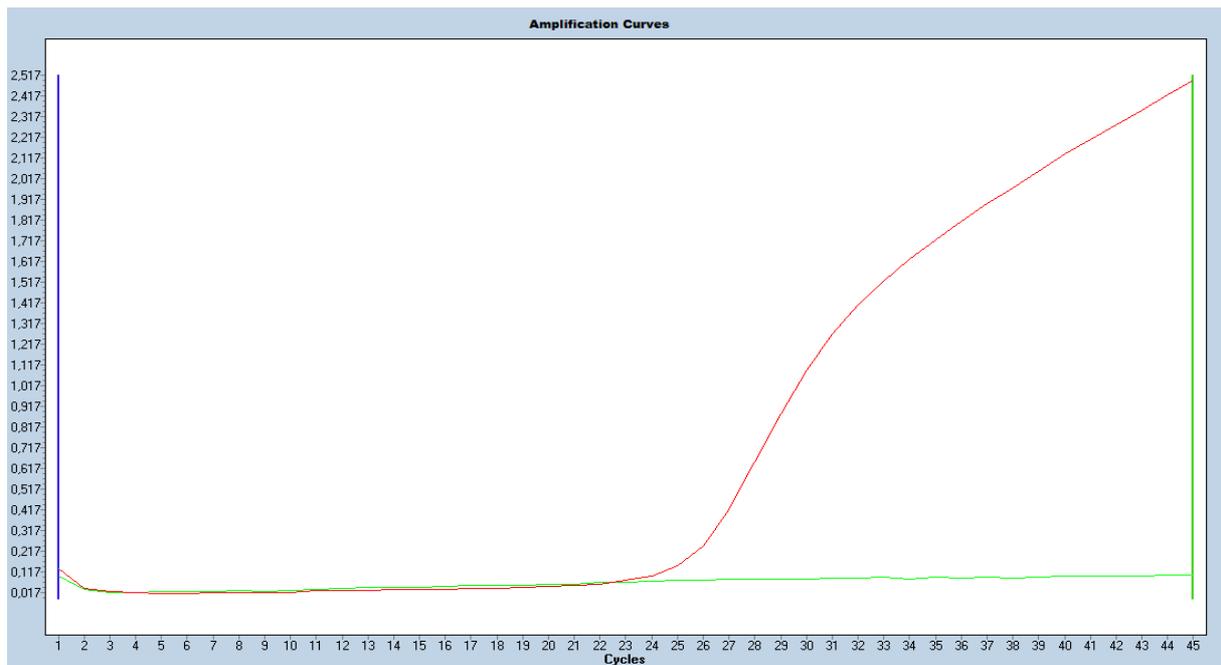
- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Realização correta do teste



**Fig. 1:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e controle negativo (verde) (RSV) no LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e controle negativo (verde) (influenza B) no LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Execução correta do controle positivo (vermelho) e controle negativo (verde) (influenza A) no LightCycler® 480II

## 11. Interpretação das amostras

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 9.

**Tabela 9:** Interpretação das amostras

Deteccção de				
Gene F (RSV A/B)	Gene NP1 (influenza B)	Gene M (influenza A)	ICR	Resultado
<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>RSV detectável</b>
negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Influenza B detectável</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Influenza A detectável</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>RSV e influenza B detectáveis</b>
<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>RSV e influenza A detectáveis</b>
negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Influenza B e influenza A detectáveis</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>Influenza A, influenza B e RSV detectáveis</b>
negativo	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>Gene-alvo não detectável</b>
negativo	negativo	negativo	<b>negativo</b>	<b>Inválido</b>

Uma amostra é positiva caso a amostra e o Internal Control RNA apresentem um sinal de amplificação no sistema de deteção.

A amostra também é positiva se o RNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o Internal Control RNA no sistema de deteção. A deteção do Internal Control RNA não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do Internal Control RNA.

Uma amostra é negativa se o RNA da amostra não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o Internal Control RNA no sistema de deteção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da deteção do Internal Control RNA.

Uma amostra é inválida se o RNA da amostra e o Internal Control RNA não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de deteção. Existem inibidores de PCR na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração. A amostra extraída deve ser diluída de 1:10 com água de PCR e re-amplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

## 12. Limitações do método

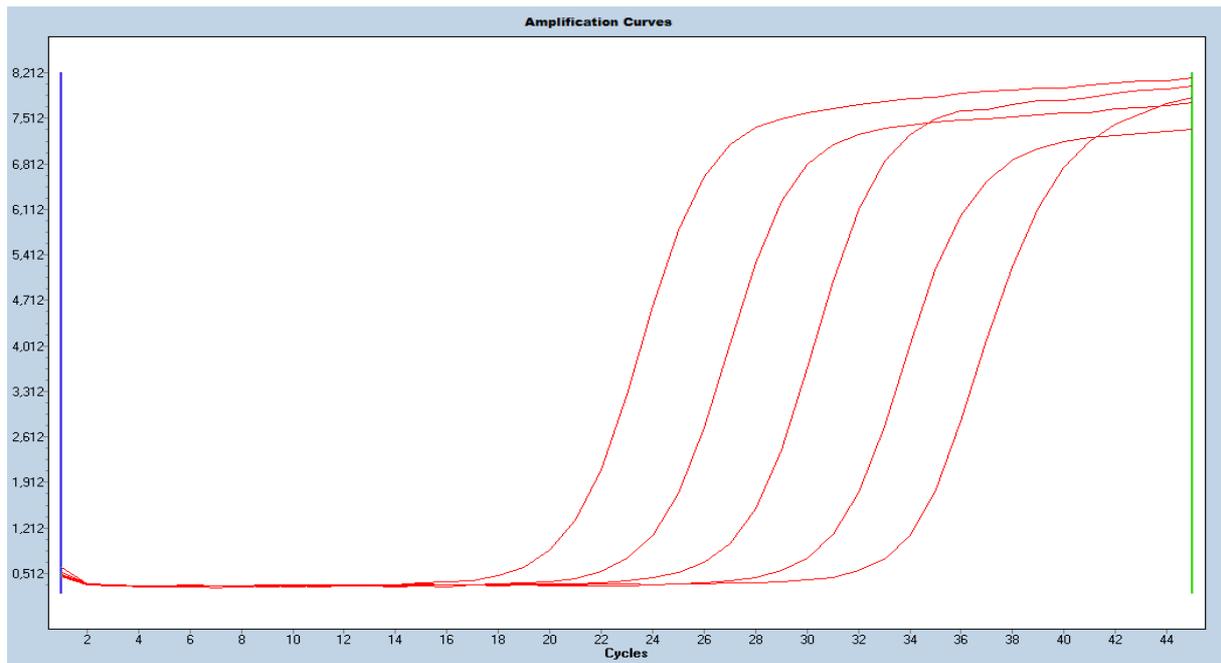
1. Este teste destina-se apenas a esfregaços nasais/garganta e BAL.
2. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado de amostras ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
3. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados não avaliáveis.
4. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o RIDA®GENE Flu & RSV.
5. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, podem ser detectadas concentrações extremamente baixas das sequências alvo abaixo do limite de detecção (LoD). Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
6. Este teste não pode ser usado para detectar o vírus influenza C.
7. Um resultado positivo no teste não indica necessariamente a presença de organismos capazes de reprodução. Um resultado positivo indica que os genes alvo (influenza A/B: Gene M e gene NP1; RSV: Gene F) estão presentes.
8. Em uma concentração testada de 3,0% e acima, a paracodina mostra um efeito inibitório.
9. A uma concentração testada de 17,5 mg/ml e superior, a ciprofloxacina mostra um efeito inibidor.

## 13. Características de desempenho

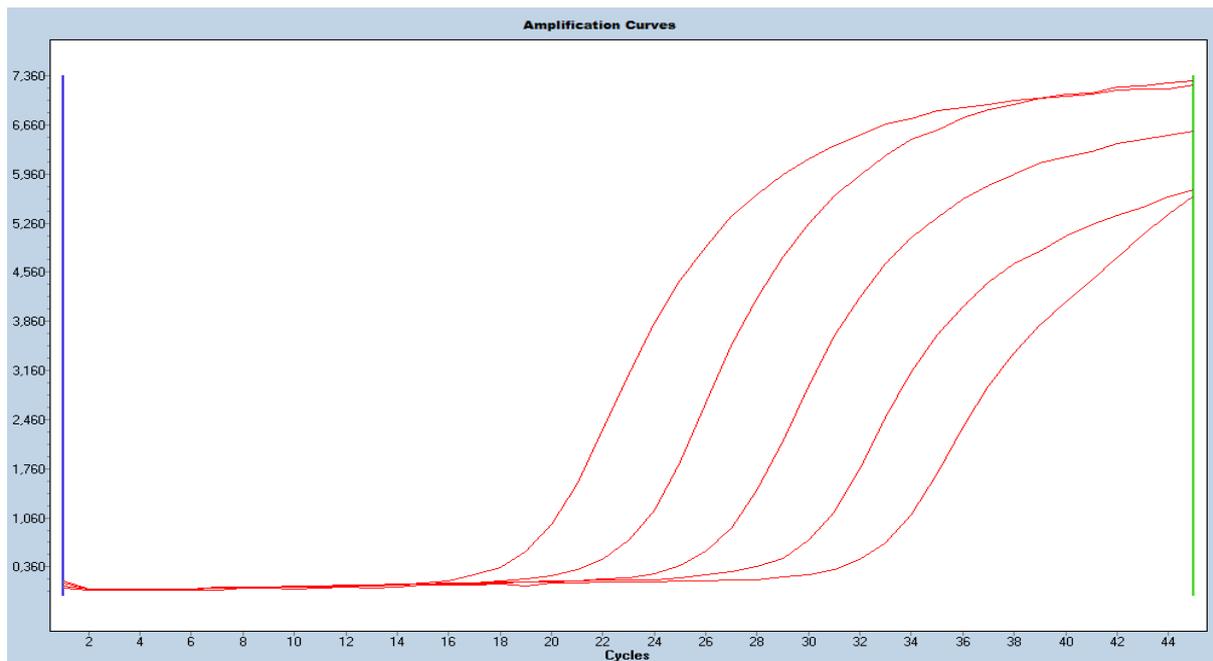
### 13.1 Sensibilidade analítica

O teste RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Flu & RSV tem um limite de detecção de  $\geq 50$  cópias/reação de RNA para RSV, influenza B e influenza A.

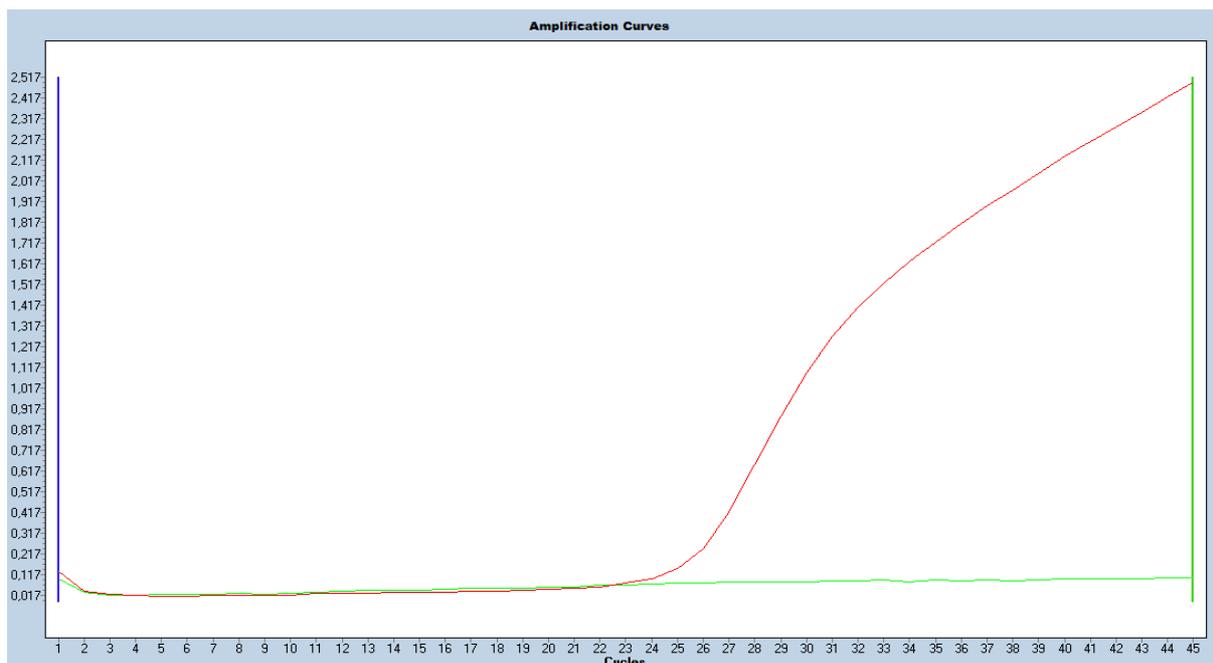
As Figuras 4, 5 e 6 abaixo mostram a série de diluições de RSV, influenza B e influenza A (cada uma com  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^1$  cópias/reação de RNA) no LightCycler® 480II.



**Fig. 4:** Séries de diluição de RSV ( $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^1$  cópias/reação de RNA) no LightCycler® 480II



**Fig. 5:** Séries de diluição de influenza B ( $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^1$  cópias/reacção de RNA) no LightCycler® 480II



**Fig. 6:** Série de diluição de influenza A ( $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^1$  cópias/reacção de RNA) no LightCycler® 480II

O limite de detecção do processo geral depende da matriz da amostra, da extração de RNA e da concentração de RNA.

### 13.2 Especificidade analítica

O RT-PCR em tempo real multiplex®GENE Flu & RSV é específico para RSV A/B, influenza A e influenza B. Nenhuma reatividade cruzada com as seguintes espécies foi detectada (consulte a Tabela 10).

**Tabela 10:** Testes de reatividade cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i> cepa 5377	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-	Coxsackievirus humano B4	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (Controle de execução externa recombinante NATtrol)	-
Adenovírus 1, humano, cepa de adenóide 71	-	Echovírus 11	-	Citomegalovírus humano	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovírus 4	-	Vírus Epstein-Barr, cepa B95-8	-	Metapneumovírus humano	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovírus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	Vírus parainfluenza humana 1, cepa C35	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
Adenovírus 31	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-	Vírus parainfluenza humana 2, cepa Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-
Adenovírus 34	-	<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	Vírus parainfluenza sorotipo 3	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Adenovírus 37	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Vírus parainfluenza humana 4a, cepa M-25	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Aspergillus terreus</i>		Enterovírus tipo 71, cepa 2003 isolada		Genogrupo A de rinovírus humano		<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Bordetella parapertussis</i> cepa 12822	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa MGH 78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-

<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	Vírus Herpes Simplex 1, cepa McIntyre	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-		
<i>Candida albicans</i>	-	Vírus Herpes Simplex 2, cepa MS	-	<i>Legionella pneumophila</i> subesp. Pneumophila	-		
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Coronavírus humano OC43	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-		
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Coronavírus humano 229E	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> cepa FH de Eaton Agent	-		
<i>Clostridium perfringens</i>	-	Coxsackievírus humano A2, cepa Fleetwood	-	<i>Neisseria meningitidis</i> cepa FAM18	-		

### 13.4 Reatividade analítica

A reatividade do RT-PCR em tempo real multiplex do RIDA® GENE Flu e RSV RT-PCR foi examinada usando diferentes cepas de vírus influenza A/influenza B e RSV (consulte a Tabela 11).

**Tabela 11:** Testes de reatividade analítica

Subtipo	Estirpe	RSV	Influenza B	Influenza A
H1N1v	Influenza A/Brisbane/02/2018	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H1N1v	Influenza A/PR/45/2015	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H1N1v	Influenza A/Califórnia/7/2009	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H1N1	Influenza A/Brisbane/59/2007	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Kansas/14/2017	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Singapura/INFIMH-16-0019/2016	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	A/Hong Kong/4801/2014	negativo	negativo	<b>positivo</b>

H3N2	Influenza A/Suíça/9715293/2013	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Texas/50/2012	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Victoria/361/2011	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Perth/16/2009	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Brisbane/10/2007	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H3N2	Influenza A/Austrália Meridional/34/ 2019	negativo	negativo	<b>positivo</b>
H7N9	Influenza A/Anhui/1/2013	negativo	negativo	<b>positivo</b>
	Influenza B/Colorado/06/2017/ linhagem Victoria	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	Influenza B/Brisbane/60/2008/ linhagem Victoria	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	Influenza B/Washington/02/2019/ linhagem Victoria	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	Influenza B/ Massachusetts/2/2012/ linhagem Yamagata	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	Influenza B/Phuket/3073/2013/ linhagem Yamagata	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	Influenza B/Wisconsin/1/2010/ linhagem Yamagata	negativo	<b>positivo</b>	negativo
	RSV A (isolado: 2006 isolado)	<b>positivo</b>	negativo	negativo
	RSV A cepa longa	<b>positivo</b>	negativo	negativo
	RSV B (cepa: CH93(18)-18)	<b>positivo</b>	negativo	negativo
	RSV B cepa 9320	<b>positivo</b>	negativo	negativo

## 14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2014-07-01	Versão anterior
2020-10-13	<b>Revisão geral:</b> 1. Uso previsto 2. Sumário e explicação do teste 4. Reagentes fornecidos 5. Instruções de armazenamento 6. Reagentes necessários, mas não fornecidos 8. Coleta e armazenamento de amostra 9. Realização do teste 10. Controle de qualidade 11. Interpretação das amostras 12. Limitações do método 13. Características de desempenho 14. Histórico de versões 15. Explicação dos símbolos 16. Referências

## 15. Explicação dos símbolos

### Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de conservação
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

## 16. Referências

1. World Health Organisation 2009, Fact Sheet N°211, Influenza (Saisonal)  
[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html). Last accessed: 09.10.2020.
2. Robert Koch Institut  
RKI\_Influenzabericht\_2018-19  
[https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI\\_Influenzabericht\\_2018-19.pdf](https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/6253/RKI_Influenzabericht_2018-19.pdf). Last accessed: 30.10.2020
3. Robert Koch Institut  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Influenza\\_saisonal.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Influenza_saisonal.html). Last accessed: 09.10.2020.
4. World Health Organisation 2011, Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
5. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_RSV.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html)  
Last accessed: 15.10.2020