

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV

Handbook for the following references/

Handbuch für folgende Medizinprodukte:

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

BD REF 444217

to be used with the BD MAX™ System

zur Verwendung mit dem BD MAX™ System



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection and differentiation of RNA from the SARS-CoV-2, Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) and/or Human Respiratory Syncytial Virus A/B (RSV) in respiratory samples from individuals suspected of COVID-19 or other respiratory infection by their healthcare provider. This test is intended to be used as an aid in the identification of the presence of the SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV viral RNA. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from respiratory specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV.

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 contain 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 SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the identification of SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and /or RSV in respiratory samples. 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 two conserved regions of N gene (N1 and N2) for SARS-CoV-2, a conserved region of the M1 gene for Flu A and Flu B, and a conserved region of the N gene for RSV using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV 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 SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is composed of two different reaction tubes. One of the tubes detects and differentiates the RNA from Flu A, Flu B and/or RSV (Transparent Red or 1A foil) and the other tube detects specifically the RNA from SARS-CoV-2 (Transparent Green or 1G foil). Each tube contains all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an internal control (endogenous in the SARS-CoV-2 reaction tube) to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The SARS-CoV-2 assay uses a human housekeeping gene as an endogenous Internal Control (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. Each RNA targets are amplified and detected in specific channels (475/520, 585/630, and/or 630/665) and the internal control (IC) in channel 530/565. In the Flu A, Flu B and/or RSV assay, Flu A RNA target is amplified and detected in channel 475/520, Influenza B RNA target in channel 585/630, RSV RNA target in channel 630/665 and the internal control (IC) of this assay in channel 530/565. In SARS-CoV-2 assay, N2 target is amplified and detected in channel 475/520, N1 target in channel 630/665 and the endogenous internal control (IC) in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color/Barcode	Amount
VS-ABR212R	Flu A, Flu B & RSV reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Red or 1A foil	2 pouches of 12 tubes
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Transparent Green or 1G foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange or 11 foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-FNR124 (444217).

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 SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 or 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)



- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents at all times. 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.
- Make sure to use a tube to determine RNA from Influenza A, Influenza B and RSV in Snap-In 2 (green position) and another tube to determine RNA from SARS-CoV-2 in Snap-In 4 (blue position). Be careful not to mix them throughout the entire process.
- 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 or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been validated on nasopharyngeal/ oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) Vircell S.L., Spain).

Other types of samples from nasopharyngeal/oropharyngeal swabs in VTM must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 48 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 48 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 48 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.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

1. Pipette 400 µL of nasopharyngeal/ oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) into a BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

Note: The Flu A, Flu B & RSV reaction tube has been validated with a sample volume of 200-400 µL and the SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube with a sample volume of 400-750 µL.

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 SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2,FluA+B,RSV).
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "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: 1A (concerning Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G (concerning SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) "PCR Settings" and "Test Steps" must be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.
- 10) Snap-In 2 (green). In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).

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

Table 2. PCR settings.

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.

- 11) Snap-In 2 (green). In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well.



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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

12) Snap-In 2 (green). In “Test Steps” tab, enter the PCR protocol (Table 4).

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

Table 4. PCR protocol.

13) Snap-In 4 (blue). In “PCR settings” tab enter the following parameters: “Channel Settings”, “Gains” and “Threshold” (Table 5).

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 N2 target	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Endogenous IC	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 N1 target	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 5. 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.

14) Snap-In 4 (blue). In “PCR settings” tab enter the following parameters “Spectral Cross Talk” (Table 6), as well.



		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 6. Spectral cross-talk parameters.

15) Snap-In 4 (blue). In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 7).

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 7. PCR protocol.

16) Click the "Save Test" button.

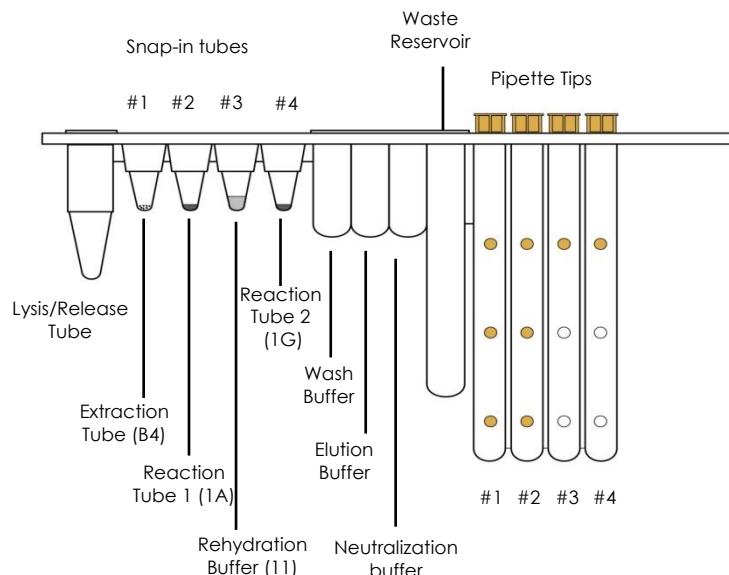
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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 Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (red or 1A 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.
 - 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.
- Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange or 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.
 - 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 product is at the bottom of the tube.



- 5) Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 ($N1 + N2$) reaction tubes (green or 1G 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.
 - 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.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- In the "Test" drop down menu, select VSARSCoV2, FluA+B, RSV (if not already created see Section 8.3.1).
- Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist 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.
- Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 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).
- Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- Close the BD MAX™ System door.
- 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 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Tables 8 and 9.

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 tables:

a. Flu A, Flu B & RSV reaction tube: Snap-In 2

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- ¹	Flu A, Flu B and RSV RNA Detected¹
+	-	-	+/- ¹	Flu A RNA Detected, Flu B and RSV RNA Not Detected¹
+	+	-	+/- ¹	Flu A and Flu B RNA Detected, and RSV RNA Not Detected¹
+	-	+	+/- ¹	Flu A and RSV RNA Detected, and Flu B RNA Not Detected¹
-	+	-	+/- ¹	Flu B RNA Detected, Flu A and RSV RNA Not Detected¹
-	+	+	+/- ¹	Flu B and RSV RNA Detected, Flu A RNA Not Detected¹
-	-	+	+/- ¹	RSV RNA Detected, Flu A and Flu B RNA Not Detected¹
-	-	-	+ ²	Flu A, Flu B and RSV RNA Not Detected²
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 8. Sample interpretation Flu A, Flu B & RSV reaction tube

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred



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

2 A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct less than 40). 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.

b. SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube: Snap-In 4

SARS-CoV-2 (N2 target) (475/520)	Endogenous Internal Control (530/565)	SARS-CoV-2 (N1 target) (630/665)	Interpretation
+	+/- ³	+	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected³
+ ⁴	+/- ³	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected^{3,4}
-	+ ⁵	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected⁵
-	- ⁵	-	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. ⁵
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	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 9. Sample interpretation SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

4 If only one target site of the N gene amplifies, verify the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. In case of a doubtful interpretation, depending on the available material, it is also recommended to:

- a) re-extract and re-test another aliquot of the same specimen (if possible, increase sample volume to 750 µl) or,
- b) obtain a new specimen and re-test.

5 In the case of SARS-CoV-2 target sites negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human housekeeping gene that should be present



in all human nucleated cells in the original sample. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the endogenous Internal Control, the result is considered as 'Unresolved', and retesting is required.

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.
- 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, Flu A, Flu B and/or RSV either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of conserved regions of N gene (SARS-CoV-2) used in VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System have been designed based on the US CDC assay for specific detection of SARS-CoV-2 by amplifying two unique regions of the N gene. They do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, SARS-CoV or other coronaviruses, 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 viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2, Flu and/or RSV variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.



- The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- In SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube, a single-target site amplification or even random positive results is suggestive of slightly different amplification yield of the target site of the *N* gene. Samples with low viral load might result in *N* single target amplification. In case of a doubt, it is recommended referring to a reference laboratory for further testing.
- Some samples (in SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube) 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, Flu and/or RSV RNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2, Flu and/or RSV infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by SARS-CoV-2 and novel Influenza A strain have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2, Flu and/or RSV infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an internal control in each Flu A, Flu B & RSV reaction tube and an endogenous internal control in each SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested individually in each reaction tube.

The clinical performance of Flu A, Flu B & RSV reaction tube was tested using 344 respiratory specimens (oropharyngeal swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

The results were as follows:



Flu A, B & RSV reaction tube	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	157	2*	159
	-	7*	178	185
	Total	164	180	344

Table 10. Comparative results for Flu A.

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

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

Flu A, Flu B & RSV reaction tube	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	99	4*	103
	-	1*	240	241
	Total	100	244	344

Table 11. Comparative results for Flu B.

Positive percent agreement is >99% and negative percent agreement is >98%.

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

Flu A, Flu B & RSV reaction tube	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Total
	+	22	4*	26
	-	3*	315	318
	Total	25	319	344

Table 12. Comparative results for RSV.

Positive percent agreement is >88% and negative percent agreement is >99%.

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

The clinical performance of SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube was tested using 254 respiratory samples (nasopharyngeal swabs in Vircell Transport medium) from patients with clinical suspicion of COVID-19 disease or other similar respiratory diseases. The results were compared with those obtained with the clinical diagnosis performed with Simplexa™ COVID-19 Direct assay with discrepant analysis performed with the Charité protocol.



SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Alternative RT-PCR assays			
		+	-	Total
+	63	2*	65	
-	0	189	189	
Total	63	191	254	

Table 13. Comparative results for SARS-CoV-2.

*Initial diagnose of one of the two samples was invalid and reported to the patient as positive for prevention and quarantine period.

SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube detected two positive samples that were not detected using Simplexa™ COVID-19 Direct assay and the Charité protocol.

The Positive Percent Agreement (PPA) and the Negative Percent Agreement (NPA) for SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube are >99% and 98%, respectively.

Results show high agreement to detect SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV viruses using VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit of ≥ 10 genome copies per reaction for Flu A, ≥ 20 genome copies per reaction for Flu B, ≥ 2 genome copies per reaction for RSV and ≥ 5 genome copies per reaction for SARS-CoV-2 with a positive rate of $\geq 95\%$ (Figures 2, 3, 4, 5 and 6).

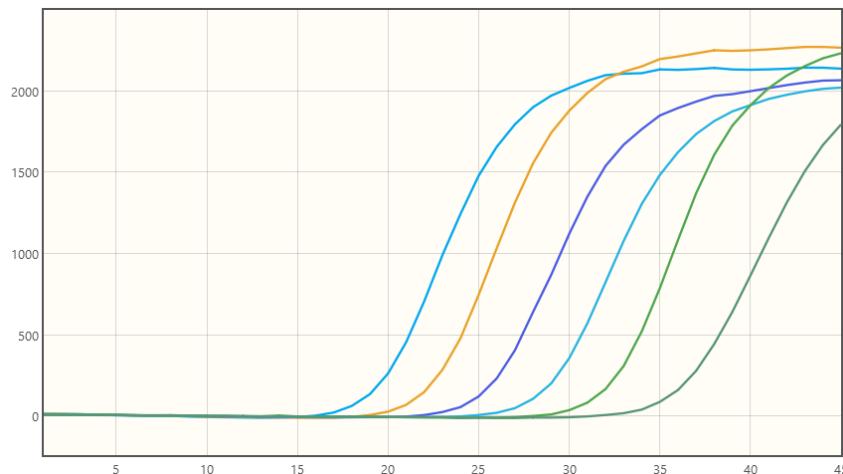
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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

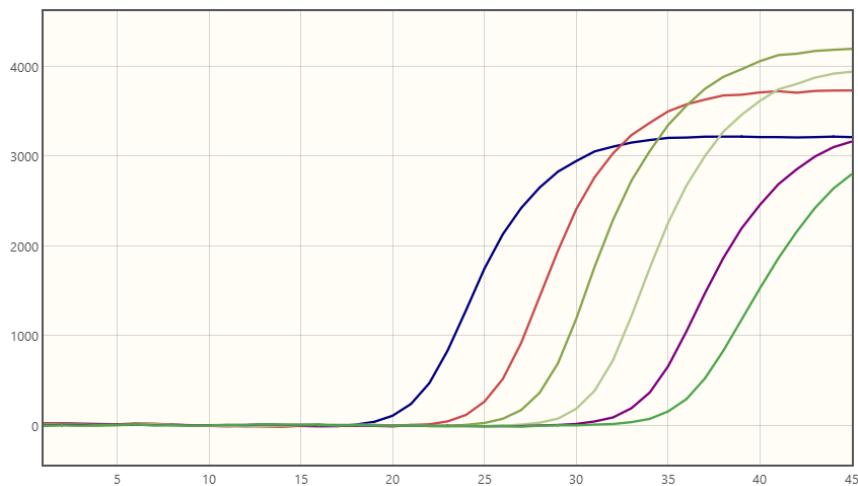


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

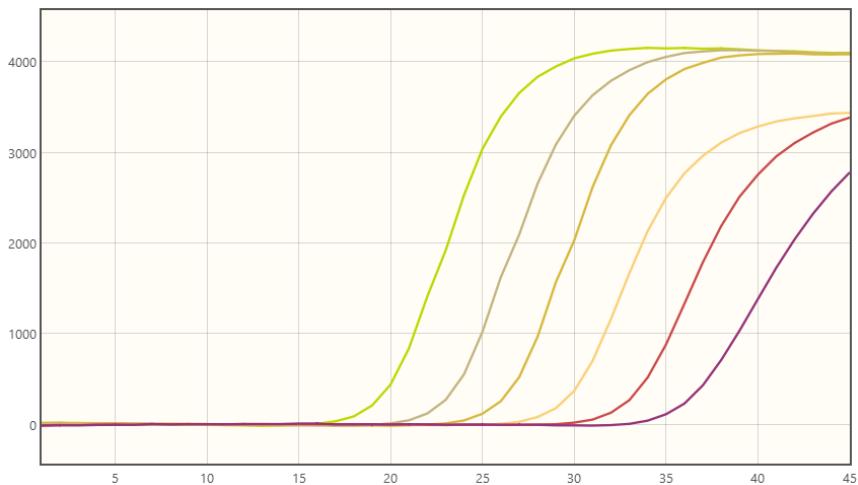


Figure 5. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

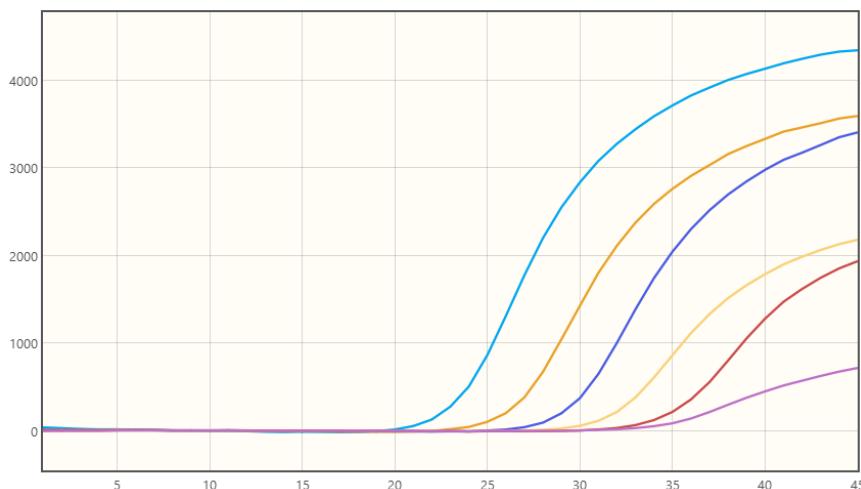
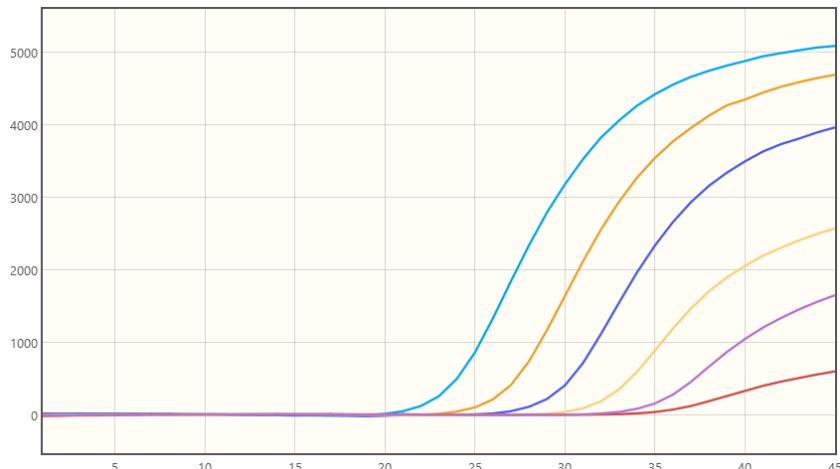


Figure 6. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a)	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus	-/+
Bocavirus	-	Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a)	-/+	Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017 virus	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016 virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/207/06 virus	-/+
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus	-/+



Cross-reactivity testing						
MERS Coronavirus	-	Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Nevada/3/2011 virus	-/+	
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-/+	Influenza B/New Jersey/1/2012 virus	-/+	
SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C) virus	-/+	Influenza B/Texas/02/2013 virus	-/+	
SARS-CoV-2 strain 2019-nCoV/Italy-INMI1	-/+	Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus	-/+	Influenza B/Townsville/8/2016 virus	-/+	
SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Canberra/11/2016 virus	-/+	
SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus	-/+	Influenza B/Florida/4/2006 virus	-/+	
SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020	-/+	Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Florida/07/2004 virus	-/+	
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IDCDC-RG6 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Guangdong/120/2000 virus	-/+	
Enterovirus Echovirus 11 and 30	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Hubei Wujigang/158/2009 (NYMC BX-39) virus	-/+	
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/ Jiangsu/10/2003 virus	-/+	
Haemophilus influenzae MinnA	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus	-/+	Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus	-/+	
Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus	-/+	
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-/+	
Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Texas/06/2011 virus	-/+	
Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus	-/+	
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus	-/+	
Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1)	-/+	Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus	-/+	Legionella bozemani	-	
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-/+	Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus	-/+	Legionella dumoffii	-	
Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus	-/+	Legionella longbeachae	-	



Cross-reactivity testing						
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus	-/+	Legionella micdadei	-	
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus	-/+	Legionella pneumophila	-	
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus	-/+	Human metapneumovirus A and B	-	
Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus	-/+	Moraxella catarrhalis	-	
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus	-/+	Mycoplasma pneumoniae	-	
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus	-/+	Mycobacterium tuberculosis not rifampin resistant	-	
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus	-/+	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-	
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus	-/+	Pneumocystis jirovecii Type A1 and g885652	-	
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus	-/+	Human rhinovirus type C	-	
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4) virus	-/+	Staphylococcus aureus subsp. aureus	-	
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	-/+	Staphylococcus epidermidis	-	
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus	-/+	Streptococcus pneumoniae Z022	-	
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus	-/+	Streptococcus pyogenes	-	
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	-/+	Streptococcus salivarius	-	
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus	-/+	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B (strain CH93(18)-18)	-/+	
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-/+	Human Respiratory Syncytial Virus strain Long	-/+	
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus	-/+			

Table 14. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **SARS-CoV-2** was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1,



Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, synthetic RNA controls for two variants of the SARS-CoV-2 virus: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) and MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), showing positive result.

The reactivity of the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza A** was evaluated against RNA extracted from the following strains: Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) virus (Clade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus, Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus,



Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus, showing positive result.

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

The reactivity of the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **RSV** was confirmed against RNA extracted from RSV A and B (strain CH93(18)-18) and Human Respiratory Syncytial Virus strain Long, showing positive result.



DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist ein automatisierter Echtzeit-RT-PCR-Kit, der zum qualitativen Nachweis und zur Differenzierung der RNA von SARS-CoV-2, Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) und/oder Humanem Respiratorischen Synzytialvirus A/B (RSV) in Atemwegsproben bei Personen mit Verdacht auf COVID-19 oder eine andere Atemwegsinfektion durch ihren Arzt vorgesehen ist. Dieser Test wird als Hilfsmittel zum Nachweis der Virus-RNA von SARS-CoV-2, Flu A, Flu B und/oder RSV eingesetzt. Der Assay nutzt das BD MAX™ System zur automatisierten RNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems. Dazu wird RNA aus Atemwegsproben extrahiert, durch RT-PCR amplifiziert und mithilfe von Sonden mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff, die spezifisch für SARS-CoV-2, Flu A, Flu B und/oder RSV sind, nachgewiesen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Coronaviren sind behüllte RNA-Viren mit nicht-segmentiertem positivsträngigem Genom, die zur Familie Coronaviridae gehören. Es sind sechs Coronavirus-Spezies bekannt, die beim Menschen Krankheiten verursachen. Vier Viren (229E, OC43, NL63 und HKU1) lösen Symptome grippaler Infekte aus, die anderen beiden (das SARS-assoziierte Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus, SARS-CoV) und das MERS-Coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)) sind zoonotische Viren und verursachen schwerwiegender Komplikationen. SARS-CoV und MERS-CoV haben in den letzten beiden Jahrzehnten zu mehr als 10.000 kumulativen Fällen geführt, wobei die Mortalitätsrate bei der MERS-CoV-Infektion 34 % und bei der SARS-CoV-Infektion 10 % betrug.

Im Dezember 2019 trat bei einigen Personen, die im Großhandelsmarkt Huanan für Meeresfrüchte in Wuhan in der Provinz Hubei, China, arbeiteten oder in dessen Umgebung wohnten, eine Lungenentzündung unbekannter Ursache auf. Die Analyse der Atemwegsproben von Erkrankten durch Tiefensequenzierung wies auf ein neuartiges Coronavirus hin, das zunächst als „2019 neuartiges Coronavirus (2019-nCoV)“ und später als „SARS-CoV-2“ bezeichnet wurde.

Die Übertragung des SARS-CoV-2 von Mensch zu Mensch, selbst während der symptomlosen Inkubationszeit, wurde bestätigt. Das Virus verursacht eine schwere Atemwegserkrankung ähnlich der, die das SARS-CoV auslöst. Die Lungenentzündung ist war die primäre mit dem Virus assoziierte Erkrankung, jedoch kam es bei einigen Patienten zu schwerer Pneumonie, Lungenödem, akutem Atemnotsyndrom, Multiorganversagen und zum Tod. Laut den Centers of Disease Control and Prevention (CDC) können die Symptome einer SARS-CoV-2-Infektion bereits 2 Tage oder auch erst 14 Tage nach der Exposition auftreten, wobei die häufigsten Fieber oder Schüttelfrost, Husten, Müdigkeit, Anorexie, Muskelschmerzen und Atemnot sind. Weniger häufige Symptome sind Halsschmerzen, Nasenverstopfung, Kopfschmerzen, Durchfall, Übelkeit und Erbrechen. Ein Verlust des Geruchs- (Anosmie) oder Geschmackssinns (Ageusie), der dem Einsetzen der Atemwegssymptome vorausgeht, wurde ebenfalls beobachtet. Bei älteren Erwachsenen oder Personen mit schweren Vorerkrankungen wie Herz- oder



Lungenerkrankungen oder Diabetes scheint ein höheres Risiko für die Entwicklung schwererer Komplikationen infolge der Erkrankung an COVID-19 zu bestehen.

Die CDC empfehlen zur Identifikation von SARS-CoV-2 und anderen Atemwegsviren wie Influenzaviren und RSV Proben aus den oberen Atemwegen (nasopharyngeale (NP) und oropharyngeale (OP) Abstriche, Abstriche der mittleren Nasenmuschel, Nasenabstriche, nasopharyngeale Spülungen/-aspirate oder Nasenspülungen/-aspirate (NW), gewonnen in der Regel durch eine medizinische Fachkraft) und/oder Proben aus den unteren Atemwegen (Sputum, endotracheales Aspirat oder bronchoalveolare Lavage bei Patienten mit schwererer Atemwegserkrankung).

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* und sind für den Großteil der Virusinfektionen in den unteren Atemwegen verantwortlich. In Anbetracht der Tatsache, dass im Fall von älteren und geschwächten Personen ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung schwerer Erkrankungen und Komplikationen, wie z. B. Lungenentzündung, besteht, sind Influenza A und B weltweit eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität. Bei Erkrankten treten einige oder alle der folgenden Symptome auf: Fieber oder Fiebergefühl/Schüttelfrost, Husten, Halsschmerzen, Nasenverstopfung und Nasenlaufen, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen und Appetitlosigkeit. Die Influenzaviren werden auf zwei verschiedenen Wegen von Mensch zu Mensch übertragen: durch die Luft (über große Tröpfchen oder Aerosole, die beim Niesen oder Husten entstehen) und durch direkten oder indirekten Kontakt.

Influenza A und B sind behüllte, einzelsträngige RNA-Viren, die acht segmentierte Stränge genomicscher RNA enthalten. Diese codiert in der Regel für 11 oder 12 Virusproteine. Die Virushülle, die aus der Plasmamembran des Wirts gebildet wird, besteht aus einer Lipiddoppelschicht von Transmembranproteinen wie z. B. Hämagglyutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie den Matrixproteinen M1 und M2. Influenza-A-Viren werden entsprechend der Antigenität ihrer „HA“- und „NA“-Moleküle weiter in Subtypen klassifiziert, während Influenza-B-Viren antigenetisch und genetisch in 2 verschiedene Linien, Victoria und Yamagata, unterteilt werden.

Die Humanen Respiratorischen Synzytialviren A und B (RSV) gehören zur Familie der *Paramyxoviridae* und sind der wichtigste Auslöser von akuten Atemwegsinfektionen. RSV ist ein behülltes Virus mit einem nicht segmentierten, einzelsträngigen, linearen RNA-Genom. Das Humane Respiratorische Synzytialvirus ist ein häufiger Auslöser von Atemwegsinfektionen wie Bronchitis, Lungenentzündung und chronisch obstruktiver Lungenentzündung bei Personen aller Altersgruppen. Bei Erkrankten treten häufig einige oder alle der folgenden Symptome auf: Rhinorrhö, niedriggradiges Fieber, Husten, Halsschmerzen, Kopfschmerzen und Giemen. RSV wird durch große nasopharyngeale Sekrettröpfchen von infizierten Personen, engen Kontakt oder Selbstdinokulation nach Berühren kontaminiierter Oberflächen übertragen.

Die Diagnose kann problematisch sein, da eine Vielzahl pathogener Keime akute Atemwegsinfektionen mit ähnlichen klinischen Syndromen verursachen kann. Echtzeit-PCR-Tests haben sich als empfindliches und spezifisches diagnostisches Hilfsmittel zum Nachweis der Viren SARS-CoV-2, Flu A, Flu B und RSV erwiesen.

3. Verfahrensprinzip

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde für die Identifizierung von SARS-CoV-2 , Flu A, Flu B und/oder RSV in Atemwegsproben entwickelt. Der Nachweis erfolgt im



Einschritt-Echtzeit-RT-PCR-Verfahren, bei dem die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Das isolierte RNA-Target wird durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA transkribiert, woraufhin die Amplifikation und der Nachweis zweier konservierter Regionen N-Gens (N1 and N2) von SARS-CoV-2, einer konservierten Region des M1-Gens von Flu A und Flu B und einer konservierten Region des N-Gens von RSV mithilfe spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden erfolgen.

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System umfasst zwei verschiedene Reaktionsröhren. Eines davon dient zur Unterscheidung zwischen den RNAs von Flu A, Flu B und/oder RSV (transparent rot oder 1A-Folie), mit dem anderen wird spezifisch die RNA von SARS-CoV-2 nachgewiesen (transparent grün oder 1G-Folie). Alle Röhrchen enthalten alle für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase, Reverse Transkriptase) in stabilisierter Form sowie eine interne Kontrolle (endogen, im SARS-CoV-2-Reaktionsröhren) zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität. Der SARS-CoV-2-Assay nutzt ein menschliches Haushaltsgen als endogene interne Kontrolle, das humane RNase P-Gen. Menschliche Haushaltsgene sind an den grundlegenden Erhaltungsfunktionen in Zellen beteiligt. Daher wird davon ausgegangen, dass sie in allen kernhaltigen humanen Zellen vorliegen und in ein relativ konstantes Expressionsniveau zeigen. Jede Ziel-RNA wird in einem eigenen spezifischen Kanal (475/520, 585/630 und/oder 630/665), die interne Kontrolle (IK) in Kanal 530/565 amplifiziert und nachgewiesen. Beim Test auf Flu A, Flu B und/oder RSV wird die Flu-A-Ziel-RNA in Kanal 475/520, die FLU-B-Ziel-RNA in Kanal 585/630, die RSV-Ziel-RNA in Kanal 630/665 und die interne Kontrolle (IC) für diesen Test in Kanal 530/565 amplifiziert und nachgewiesen. Beim Test auf SARS-CoV-2 wird die N2-Ziel-RNA im Kanals 475/520, die N1-Ziel-RNA im Kanal 630/665 und die interne Kontrolle (IC) im Kanal 530/565 amplifiziert und nachgewiesen.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Im VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sind die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten:



Referenznummer	Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe/Barcode	Menge
VS-ABR212R	Flu A, Flu B & RSV reaction tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primer, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Transparent Rote oder 1A-Folie	2 Beutel mit je 12 Röhrchen
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und einer endogenen internen Kontrolle in stabilisierter Form	Transparent Grün oder 1G-Folie	2 Beutel mit je 12 Röhrchen
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Transparent Orange oder 1I-Folie	1 Beutel mit 24 Röhrchen

Tabelle 1. Im VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit der Kat.-Nr. VS-FNR124 (444217) enthaltene Reagenzien und Materialien.

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der nachstehenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.-Nr.:442827 oder 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.-Nr.: 437519)
- Vortexmischer.
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl).
- Filterspitzen.
- Puderfreie Einweghandschuhe.

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel können die darin enthaltenen Reaktionsgefäß bis zu 28 Tage verwendet werden.

7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für die Verwendung durch Fachpersonal, wie Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und -techniker vorgesehen, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.



- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, das BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderliche Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen Kontamination durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase)/Desoxyribonuklease (DNase). Es wird die Verwendung von RNase-/DNase-freien, aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen Handschuhe wechseln.
- Stellen Sie sicher, dass Sie das eine Röhrchen zum Nachweis der RNA von Influenza-A-Viren, Influenza-B-Viren und RSV in der Position „Snap-in 2“ (grün) und das andere Röhrchen zum Nachweis der RNA von SARS-CoV-2 in Position „Snap-In 4“ (blau) testen. Achten Sie während des gesamten Vorgangs darauf, diese nicht durcheinander zu bringen.
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die „BD MAX™ PCR Cartridge“ (BD MAX™ PCR-Kartusche) nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der „BD MAX™ PCR Cartridge“ (BD MAX™ PCR-Kartusche) ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken oder rauchen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, Lagerung, Verarbeitung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.



8. Verfahren

8.1. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -TRANSPORT

Das VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde anhand von nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichen validiert, die in Virustransportmedium (VTM) von Vircell S.L., Spanien, entnommen wurden.

Andere Arten von Proben aus nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichen in VTM müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind Atemwegsabstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten Gefäß mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material und nicht länger als 48 Stunden bei 2 bis 8 °C transportiert werden. Für den Langzeittransport (über 48 Stunden) empfehlen wir eine Beförderung bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 2 bis 8 °C bis zu 48 Stunden lang oder zur Konservierung bei -20 °C oder idealerweise bei -70 °C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

8.2. PROBENVORBEREITUNG UND RNA-EXTRAKTION

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-3 aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

1. Pipettieren Sie 400 µl des in Virustransportmedium (VTM) entnommenen nasopharyngealen/ oropharyngealen Abstrichs in ein BD MAX™ TNA-3 Probenpufferröhrchen und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.

Hinweis: Das Flu A, Flu B & RSV reaction tube wurde mit einem Probenvolumen von 200-400 µl, das SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube wurde mit einem Probenvolumen von 400-750 µl validiert.

8.3. PCR-PROTOKOLL

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.



8.3.1. Erstellen eines Testprogramms für den VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie den VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR-Detektionstest bereits erstellt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt zu Schritt 8.3.2 übergehen.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).
- 3) Benennen Sie in der Registerkarte „Basic Information“ (grundlegende Informationen) im Fenster „Test Name“ (Testname) Ihren Test, d. h.: VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2, FluA+B,RSV).
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Mastermix konzentriert lyophilisiert MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert) und stellen Sie das Probenvolumen auf 950 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 verwenden und barcodierte Folien-Snap-in-Röhrchen einsetzen, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Kundendefinierte Barcodes) die folgende Konfiguration:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Barcode für Snap-In 2): 1A (betrifft das Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (betrifft das Rehydration Buffer Tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode (Barcode für Snap-In 4): 1G (betrifft das SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) Für die Positionen Snap-In 2 (grün) und Snap-In 4 (blau) müssen Informationen zu „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) und „Test Strips“ (Teststreifen) eingegeben werden.
- 10) Snap-In 2 (grün). Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 2).



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

Tabelle 2. PCR-Einstellungen.

Hinweis: Es wird empfohlen, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzustellen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 11) Snap-In 2 (grün). Geben Sie in der Registerkarte „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 3) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfängernder Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	0,0	-	2,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	4,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabelle 3. Parameter für das spektrale Übersprechen.

- 12) Snap-In 2 (grün). Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 4) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (en))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Reverse transcription (Reverse Transkription)	Hold	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2- Temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabelle 4. PCR-Protokoll.

- 13) Snap-In 4 (Blau). Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 5).



Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	Zielregion SARS-CoV-2 N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Endogene IK	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	Zielregion SARS-CoV-2 N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 5. PCR-Einstellungen.

Hinweis: Es wird empfohlen, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzustellen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 14) Snap-In 4 (Blau). Geben Sie in der Registerkarte „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 6) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfänger Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

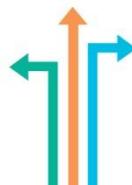
Tabelle 6. Parameter für das spektrale Übersprechen.

- 15) Snap-In 4 (Blau). Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 7) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (en))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Reverse transcription (Reverse Transkription)	Hold	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2- Temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabelle 7. PCR-Protokoll.

- 16) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).

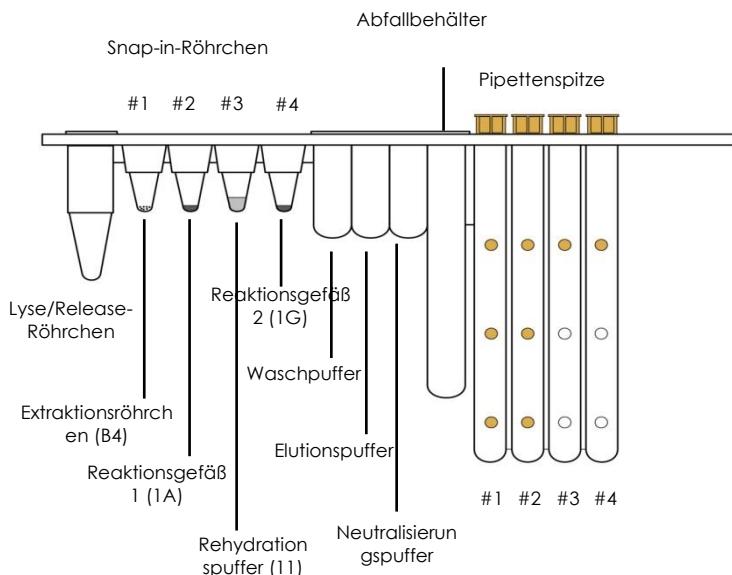


8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraktionsröhren (B4) (weiße Folie) aus den Schutzbeuteln heraus. Lassen Sie das/die Extraktionsröhren (weiße Folie) in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an Reaktionsgefäß für Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (rote oder 1A-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechende Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydration bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydration Buffer Tubes (orangefarben oder 11-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
 - a. Stellen Sie für eine korrekte Überführung bitte sicher, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- 5) Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (grün oder 1G-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechende Position im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydration bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.



Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagenzstreifen (TNA) aus dem BD MAX™ ExK TNA-3 Kit.



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VSARSCoV2,FluA+B,RSV (falls nicht bereits erstellt, siehe 8.3.1).
- 3) Wählen Sie die entsprechende Chargennummer des Kits (an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits zu finden) aus dem Auswahlmenü aus (optional).
- 4) Geben Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhren-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe ein.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Stellen Sie sicher, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.5 BD MAX™ Bericht

- 1) Klicken Sie im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder drücken Sie auf die Schaltfläche „View“ (Ansicht).
- 3) Klicken Sie auf „Print“ (Drucken) und wählen Sie folgende Optionen aus: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Durchlaufdetails, Testdetails und Plot...)



- 4) Klicken Sie im Bildschirm „Run Reports“ (Durchlaufberichte) auf die Schaltfläche „Print“ (Drucken) oder „Export“.

9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 2). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in den Tabellen 8 und 9 auszuwerten.

Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störung des BD MAX™ Systems gemeldet wurde.

Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle abzulesen und auszuwerten:

a. Flu A, Flu B & RSV reaction tube: Snap-In 2

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Interne Kontrolle (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/- ¹	Flu-A-, Flu-B- und RSV-RNA nachgewiesen ¹
+	-	-	+/- ¹	Flu-A-RNA nachgewiesen, Flu-B- und RSV-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	+	-	+/- ¹	Flu-A- und Flu-B-RNA nachgewiesen, RSV-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	-	+	+/- ¹	Flu-A- und RSV-RNA nachgewiesen, Flu-B-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	+	-	+/- ¹	Flu-B-RNA nachgewiesen, Flu-A- und RSV-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	+	+	+/- ¹	Flu-B- und RSV-RNA nachgewiesen, Flu A-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	-	+	+/- ¹	RSV-RNA nachgewiesen, Flu-A- und Flu-B-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	-	-	+ ²	Flu-A-, Flu-B- und RSV-RNA nicht nachgewiesen ²
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbarer Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 8. Probenauswertung Flu A, Flu B & RSV reaction tube

- +: Stattgefundene Amplifikation
-: Keine Amplifikation



1 Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Ein Amplifikationssignal für die interne Kontrolle kann auftreten oder auch nicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass eine hohe Kopienzahl einer Zielsequenz eine präferentielle Amplifikation zielspezifischer Nukleinsäuren anstelle der internen Kontrolle hervorrufen kann. In diesen Fällen ist der Nachweis durch die IK nicht erforderlich.

2 Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist (Ct kleiner als 40). Eine Inhibition der PCR-Reaktion im Fall eines unklaren Ergebnisses (UNR) kann ausgeschlossen werden, wenn die interne Kontrolle amplifiziert wurde. Bei Abwesenheit eines Signals für die interne Kontrolle in einer negativen Probe wird die Wiederholung des Tests empfohlen.

b. SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube: Snap-In 4

SARS-CoV-2 (Zielregion N2) (475/520)	Endogene interne Kontrolle (530/565)	SARS-CoV-2 (Zielregion N1) (630/665)	Interpretation
+	+/- ³	+	SARS-CoV-2 N-Gen-RNA nachgewiesen³
+ ⁴	+/- ³	-	SARS-CoV-2 N-Gen- RNA nachgewiesen^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	SARS-CoV-2 N-Gen- RNA nachgewiesen^{3,4}
-	+ ⁵	-	SARS-CoV-2 N-Gen-RNA nicht nachgewiesen⁵
-	- ⁵	-	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten. ⁵
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbares Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeföhrten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 9. Probenauswertung SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+: Stattgefundene Amplifikation

-: Keine Amplifikation

3 Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Die endogene interne Kontrolle (IK) kann ein Amplifikationssignal ergeben oder auch nicht. Gelegentlich ist der Nachweis der IK nicht notwendig, da das Vorliegen einer hohen Kopienzahl der Ziel-Nukleinsäure zu deren präferentieller Amplifikation führen kann.

4 Wenn nur eine Zielregion des N-Gens amplifiziert wird, überprüfen Sie, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist. Falls die Auswertung zweifelhaft ist, was vom verfügbaren Material abhängen kann, wird außerdem Folgendes empfohlen:

- a) Extrahieren und testen Sie ein weiteres Aliquot derselben Originalprobe (erhöhen Sie dabei das Probenvolumen möglichst auf 750 µl) oder
- b) entnehmen Sie eine neue Originalprobe und testen Sie diese.



5 Im Fall eines negativen Ergebnisses bei beiden SARS-CoV-2-Zielregionen muss die IK ein Amplifikationssignal bei einem Ct-Wert von weniger als 35 zeigen. Der Ct-Wert kann sehr variabel sein wegen der endogenen internen Kontrolle, die ein humanes Haushaltsgen ist, das in allen kernhaltigen menschlichen Zellen in der Originalprobe vorliegen sollte. Wenn kein Signal vorhanden ist oder der Ct-Wert der endogenen internen Kontrolle ≥ 35 ist, wird das Ergebnis als „Unresolved“ betrachtet und der Test muss wiederholt werden.

Im Fall eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, die Gebrauchsanweisung und das vom Benutzer verwendete Extraktionsverfahren zu prüfen, die ordnungsgemäße Ausführung aller RT-qPCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter sicherzustellen und zu kontrollieren, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für in VTM entnommene nasopharyngeale/ oropharyngeale Abstriche validiert.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweigrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Es besteht die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination mit SARS-CoV-2-, Flu-A-, Flu-B- und/oder RSV-Sequenzen, entweder durch Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-RNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die spezifischen Primer-Sonden-Kombinationen zum Nachweis der konservierten Regionen des beim VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System verwendeten N-Gens von SARS-CoV-2 wurden auf der Grundlage des Assays der CDC der USA für den spezifischen Nachweis von SARS-CoV-2 durch die Amplifikation zweier spezifischer Regionen des N-Gens konzipiert. Sie zeigen keine signifikante kombinierte Homologie mit dem menschlichen Genom, der humanen Mikroflora, SARS-CoV oder anderen Coronaviren, die zu einem vorhersehbaren falsch positiven Ergebnis führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch mehrere Faktoren und deren Kombinationen ergeben, darunter:



- unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
- unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion);
- Abbau der viralen RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
- Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-, Flu- und/oder RSV-Varianten beeinträchtigen können;
- eine Viruslast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
- das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen.
- Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Die Amplifikation einer einzelnen Zielregion oder selbst zufällig positive Ergebnisse im SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube weisen auf eine leicht unterschiedliche Amplifikationsausbeute für die Zielregion des N-Gens hin. In Proben mit niedriger Viruslast kann es zur Amplifikation einer einzelnen N-Zielregion kommen. Im Zweifelsfall wird empfohlen, sich wegen zusätzlicher Tests an ein Referenzlabor zu wenden.
- Einige Proben ergeben (im SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube) wegen einer zu geringen Zellzahl in der klinischen Originalprobe u. U. keine Amplifikationskurven für RNase P. Ein negatives IK-Signal schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2, Flu- und/oder RSV-RNA in einer klinischen Probe nicht aus.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Viren vorliegen oder dass diese Viren infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit viraler Zielsequenzen hin.
- Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-, Flu- und/oder RSV-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Die optimalen Probenarten sowie der Zeitpunkt während der durch SARS-CoV-2 oder neuartige Influenza-A-Stämme verursachten Infektion, zu dem virale Spitzenwerte auftreten, wurden nicht bestimmt. Zum Nachweis des Virus kann die Entnahme mehrerer Proben (unterschiedlich nach Art und Zeitpunkt) desselben Patienten erforderlich sein.
- Wenn diagnostische Tests auf andere Atemwegserkrankungen negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine SARS-CoV-2- Flu- und/oder RSV-Infektion möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
- Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmmbaren (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine Testwiederholung erforderlich. Ungelöste Ergebnisse können aufgrund von Hemmsubstanzen in der Probe oder einer inkorrekt Rehydriert des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbar oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Flu A, Flu B & RSV reaction tube eine interne Kontrolle und in jedem SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube eine endogene interne Kontrolle zur Bestätigung der korrekten Durchführung der Technik.



12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde für jeden der zwei verschiedenen Typen von Reaktionsröhren unabhängig überprüft.

Die klinische Leistungsfähigkeit der Flu A, Flu B & RSV reaction tubes wurde unter Verwendung von 344 Atemwegsproben (oropharyngeale Abstriche) von symptomatischen Patienten getestet. Die Ergebnisse wurden mit den mithilfe einer molekularen Nachweismethode (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)) erhaltenen Resultaten verglichen.

Die Ergebnisse waren wie folgt:

	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Gesamt
Flu A, Flu B & RSV reaction tube	+	157	2*	159
	-	7*	178	185
	Gesamt	164	180	344

Tabelle 10. Vergleich der Ergebnisse für Flu A.

Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt > 96 %, die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt > 99 %.

*Die niedrige Menge an Template-RNA in dieser Atemwegsprobe liegt unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode.

	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Gesamt
Flu A, Flu B & RSV reaction tube	+	99	4*	103
	-	1*	240	241
	Gesamt	100	244	344

Tabelle 11. Vergleich der Ergebnisse für Flu B.

Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt > 99%, die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt > 98%.

*Die niedrige Menge an Template-RNA in dieser Atemwegsprobe liegt unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Methode.



	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)			
		+	-	Gesamt
Flu A, Flu B & RSV reaction tube	+	22	4*	26
	-	3*	315	318
	Gesamt	25	319	344

Tabelle 12. Vergleich der Ergebnisse für RSV.

Die positive prozentuale Übereinstimmung beträgt > 88%, die negative prozentuale Übereinstimmung beträgt > 99%.

*Die niedrige Menge an Template-RNA in dieser Atemwegsprobe liegt unterhalb der Nachweigrenze der angewandten Methode.

Die klinische Leistungsfähigkeit der SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes wurde getestet unter Verwendung von 254 Atemwegsproben (nasopharyngeale Abstriche in Vircell Transportmedium) von Patienten mit klinischem Verdacht auf COVID-19 oder andere ähnliche Atemwegserkrankungen getestet. Die Ergebnisse wurden mit der mithilfe des Simplexa™ COVID-19 Direct Assays erhaltenen klinischen Diagnose verglichen, und diskrepante Ergebnisse wurden anhand des Charité-Protokolls überprüft.

	Alternative RT-PCR-Assays			
		+	-	Gesamt
SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	+	63	2*	65
	-	0	189	189
	Gesamt	63	191	254

Tabelle 13. Vergleich der Ergebnisse für SARS-CoV-2.

*Die anfängliche Diagnose für eine der beiden Proben war ungültig und wurde dem Patienten zu Präventions- und Quarantänezwecken als positiv mitgeteilt.

Mit dem SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube wurden zwei positive Proben erkannt, die bei Verwendung des Simplexa™ COVID-19 Direct Assays und des Charité-Protokolls nicht nachgewiesen wurden.

Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) für das SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube beträgt > 99 % bzw. 98 %.

Die Ergebnisse belegen eine hohe Übereinstimmung beim Nachweis von SARS-CoV-2, Flu A, Flu B und/oder RSV mit dem VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.



12.2. Analytische Empfindlichkeit

Der VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 Genomkopien pro Reaktion für Flu A, ≥ 20 Genomkopien pro Reaktion für Flu B, ≥ 2 Genomkopien pro Reaktion für RSV und $5 \geq$ Genomkopien pro Reaktion für SARS-CoV-2 mit einer Positivrate von $\geq 95\%$ (Abbildungen 2, 3, 4, 5 und 6).

Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines Flu-A-Templates ($2 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^1$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

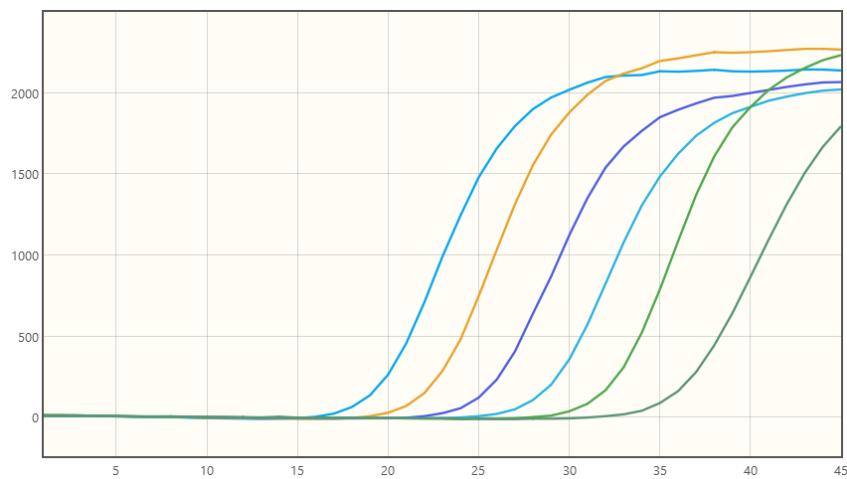


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines Flu-B-Templates ($2 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^1$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 585/630 (ROX)).

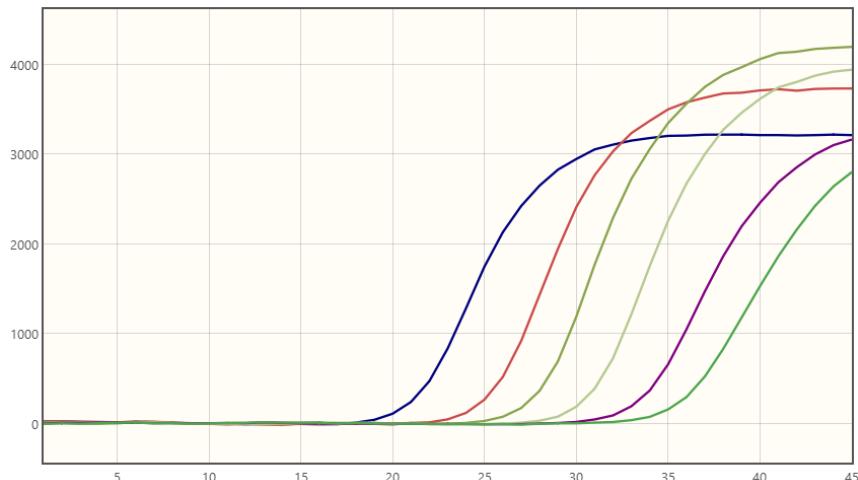


Abbildung 4. Verdünnungsreihe eines RSV-Templates ($2 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^1$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 630/665 (Cy5)).

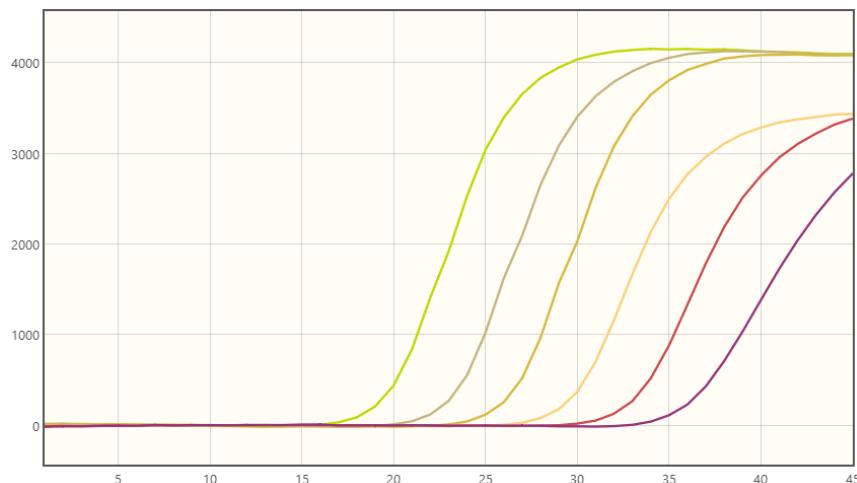


Abbildung 5. Verdünnungsreihe von SARS-CoV-2-Templates ($N1 + N2$) ($9,9 \cdot 10^4 - 9,9 \cdot 10^0$ und $5,0 \cdot 10^0$ Genomkopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

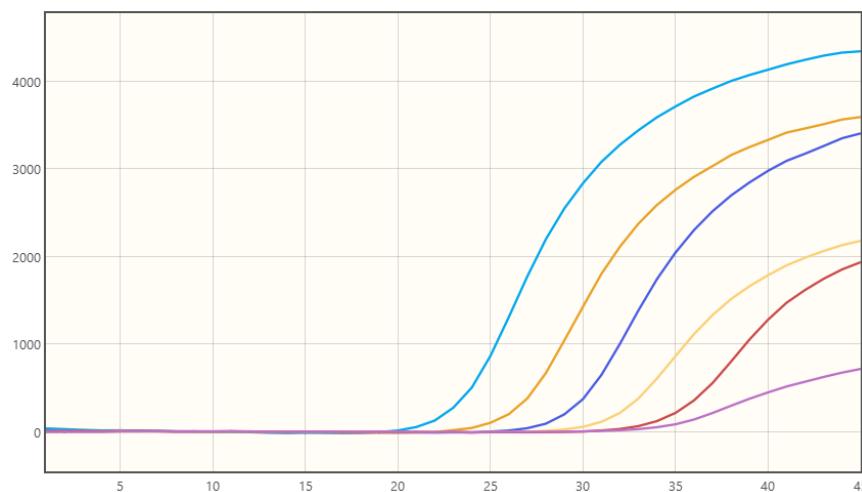
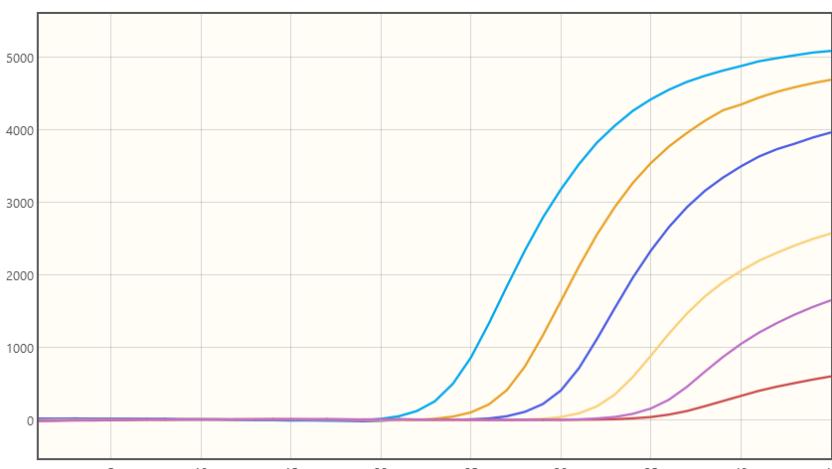


Abbildung 6. Verdünnungsreihe von SARS-CoV-2 ($N1 + N2$) ($9,9 \cdot 10^4 - 9,9 \cdot 10^0$ und $5,0 \cdot 10^0$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 630/665 (Cy5)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des Assays auf SARS-CoV-2, Flu (A+B) und RSV wurde durch Testen eines Panels mit verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen, bestätigt. Mit Ausnahme der anvisierten Erreger des jeweiligen Tests wurde zwischen keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen eine Kreuzreakтивität festgestellt.

Test auf Kreuzreaktionen					
Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2)-Virus (Klade 3C.3a)	-/+	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)-Virus	-/+
Bocavirus	-	Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2)-Virus (Klade 3C.2a)	-/+	Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)-Virus	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)-Virus	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/New York/39/2012 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26-Virus	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Brisbane/60/2008-Virus	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Colorado/6/2017-Virus	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Singapore/ INFIMH -16 - 0019/2016 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Malaysia/2506/2004-Virus	-/+
<i>Chlamydia psittaci</i> Genotyp A und C	-	Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Maryland/15/2016-Virus	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Netherlands/207/06-Virus	-/+
Humanes Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Netherlands/2518/2016 (Klade 1A)-Virus	-/+
MERS-Coronavirus	-	Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Nevada/3/2011-Virus	-/+
SARS Coronavirus Stamm Frankfurt-1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-Virus (Klade 3C2a.1)	-/+	Influenza B/New Jersey/1/2012-Virus	-/+
SARS-CoV-2 Stamm BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C)-Virus	-/+	Influenza B/Texas/02/2013-Virus	-/+
SARS-CoV-2 Stamm 2019-nCoV/Italy-INMI1	-/+	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Townsville/8/2016-Virus	-/+
SARS-CoV-2 Isolat Australia/VIC01/2020	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Canberra/11/2016-Virus	-/+
SARS-CoV-2 Isolat Wuhan-Hu-1	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza B/Florida/4/2006-Virus	-/+
SARS-CoV-2 Stamm 2019nCoV/USA/WA1/2020	-/+	Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Florida/07/2004-Virus	-/+
Enterovirus 68 und 71	-	Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Guangdong/120/2000-Virus	-/+



Test auf Kreuzreaktionen					
Enterovirus Echovirus 11 und 30	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)-Virus	-/+
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 und B3	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/ Jiangsu/10/2003-Virus	-/+
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a-Virus	-/+	Influenza B/Massachusetts/2/2012-Virus	-/+
Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Netherlands/365/2016 (Klade 3)-Virus	-/+
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Phuket/3073/2013-Virus	-/+
Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Texas/06/2011-Virus	-/+
Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010-Virus	-/+
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)-Virus	-/+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A-Virus	-/+
Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09-Virus (Klade 6B.1)	-/+	Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)-Virus	-/+	<i>Legionella bozemanii</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus	-/+	Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29-Virus	-/+	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)-Virus	-/+	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30-Virus	-/+	<i>Legionella mcdadei</i>	-
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IDCDC-RG7 (H5N1)-Virus	-/+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09-Virus	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)-Virus	-/+	Humanes Metapneumovirus A und B	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)-Virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)-Virus	-/+	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIIBRG-14) (H5N1)-Virus	-/+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IDCDC-RG (H5N1)-Virus	-/+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , nicht rifampinresistent	-
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)-Virus	-/+	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4	-
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IDCDC-4-Virus	-/+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Typ A1 und g885652	-



Test auf Kreuzreaktionen					
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)-Virus	-/+	Humanes Rhinovirus Typ C	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Klade 2.3.4.4)-Virus	-/+	Staphylococcus aureus subsp. aureus	-
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v-Virus	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8)-Virus	-/+	Staphylococcus epidermidis	-
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v-Virus	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)-Virus	-/+	Streptococcus pneumoniae Z022	-
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)-Virus	-/+	Streptococcus pyogenes	-
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)-Virus	-/+	Streptococcus salivarius	-
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)-Virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1-Virus	-/+	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV) A und B (Stamm CH93(18)-18)	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v-Virus	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-Virus	-/+	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus Stamm Long	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v-Virus	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)-Virus	-/+		

Tabelle 14. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **SARS-CoV-2** wurde überprüft anhand von RNA des humanen 2019-nCoV-Stammes BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, des humanen 2019-nCoV-Stammes 2019-nCoV/Italy-INMI1, des SARS-CoV-2-Stammes 2019-nCoV/USA-WA1/2020 sowie von synthetischen RNA-Kontrollen für zwei Varianten des SARS-CoV-2-Virus, MT007544.1 (SARS-CoV2-Isolat Australia/VIC01/2020) und MN908947.3 (SARS-CoV-2-Isolat Wuhan-Hu-1), wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **Influenza A** wurde überprüft anhand von RNA, die aus den folgenden Stämmen extrahiert wurden: Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09-Virus (Klade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus, Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015-Virus, IVR-180 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09-Virus, Influenza A/PR/8/34 (H1N1)-Virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)-Virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)-Virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)-Virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)-Virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-Virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2)-Virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v-Virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v-Virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)-Virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)-Virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)-Virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v-Virus,



Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)-Virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2)-Virus (Klade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2)-Virus (Klade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2)-Virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2)-Virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2)-Virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2)-Virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-Virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)-Virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)-Virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-Virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)-Virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-Virus (Klade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C)-Virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)-Virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)-Virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)-Virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)-Virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)-Virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)-Virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)-Virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a-Virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)-Virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1)-Virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)-Virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1)-Virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)-Virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)-Virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29-Virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)-Virus, Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30-Virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1)-Virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)-Virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)-Virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)-Virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)-Virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)-Virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4-Virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)-Virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6)-Virus (Klade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-Virus, Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)-Virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)-Virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)-Virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1-Virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-Virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)-Virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)-Virus, Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)-Virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)-Virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26-Virus, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **Influenza B** wurde überprüft anhand von RNA, die aus den folgenden Stämmen extrahiert wurden: Influenza B/Brisbane/60/2008-Virus, Influenza B/Colorado/6/2017-Virus, Influenza B/Malaysia/2506/2004-Virus, Influenza B/Maryland/15/2016-Virus, Influenza B/Netherlands/207/06-Virus, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (Klade 1A)-Virus, Influenza B/Nevada/3/2011-Virus, Influenza B/New Jersey/1/2012-Virus, Influenza B/Texas/02/2013-Virus , Influenza B/Townsville/8/2016-Virus (**B/Victoria lineage**); Influenza B/Canberra/11/2016-Virus, Influenza B/Florida/4/2006-Virus, Influenza B/Florida/07/2004-Virus, Influenza B/Guangdong/120/2000-Virus, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)-Virus, Influenza B/Jiangsu/10/2003-Virus, Influenza B/Massachusetts/2/2012-Virus, Influenza B/Netherlands/365/2016 (Klade 3)-Virus, Influenza B/Phuket/3073/2013-Virus, Influenza B/Texas/06/2011-Virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010-Virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A-Virus (**B/Yamagata lineage**), wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **RSV** wurde bestätigt anhand von RNA, die aus RSV A und B (Stamm CH93 (18)-18) und aus dem Humanen Respiratorischen Synzytialvirus Stamm Long extrahiert wurde, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

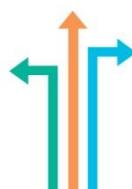


13. Bibliography/Literaturverzeichnis

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/NEJMoa2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed September 2020.
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/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed September 2020.
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> Accessed September 2020.
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> Accessed September 2020.
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> Accessed September 2020.
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-primer-probes.pdf> Accessed September 2020.
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> Accessed September 2020.



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-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance> Accessed September 2020.
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/ . Accessed September 2020.
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.

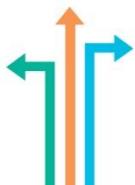


14. Symbols for IVD components and reagents/Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

IVD	<i>In vitro diagnostic device</i> <i>In-vitro-Diagnostikum</i>		Keep dry Trocken aufbewahren		Use by Verfallsdatum		Manufacturer Hersteller	LOT	Batch code (Lot) Chargennummer
	Consult Instructions for Use Siehe Gebrauchsanweisung		Temperature limitation Temperaturbegrenzung		Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)		Sample diluent Probenverdünnner		Catalognumber Katalognummer

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











CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC