

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

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

Handbook for the following references/

Manuel pour les références suivantes:

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

à utiliser avec le 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 1I 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					
Excitation Channel	Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	2.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	4.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 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.

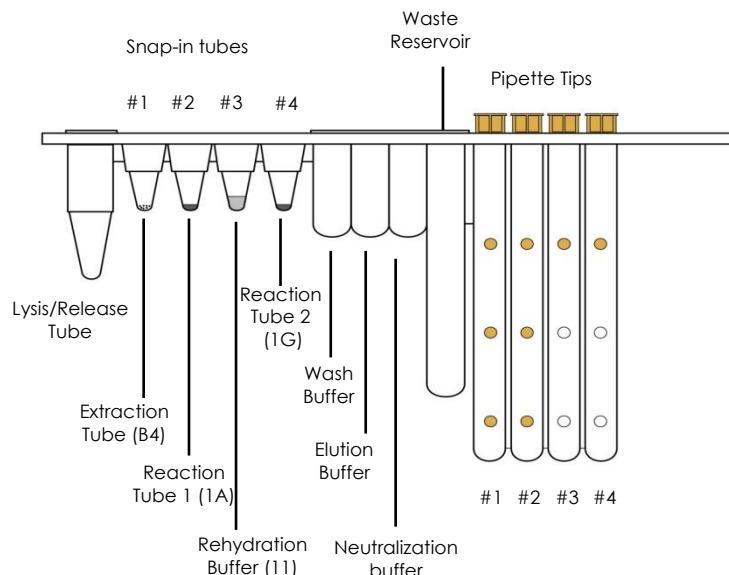
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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).

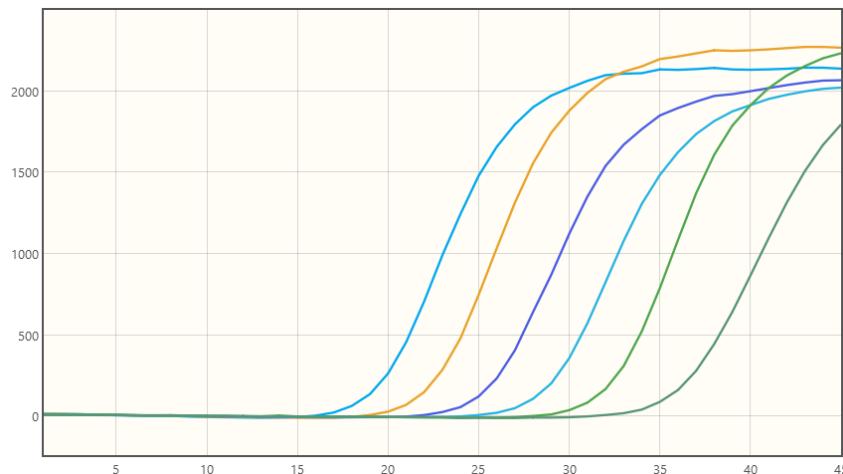
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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).

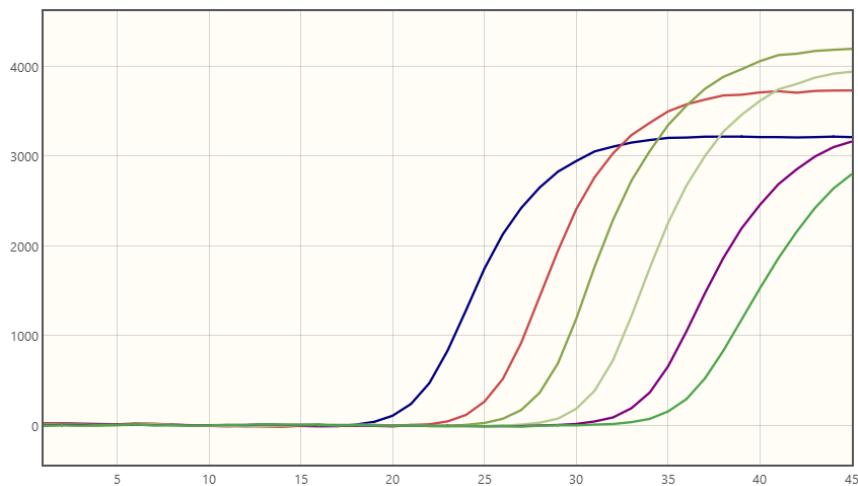


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

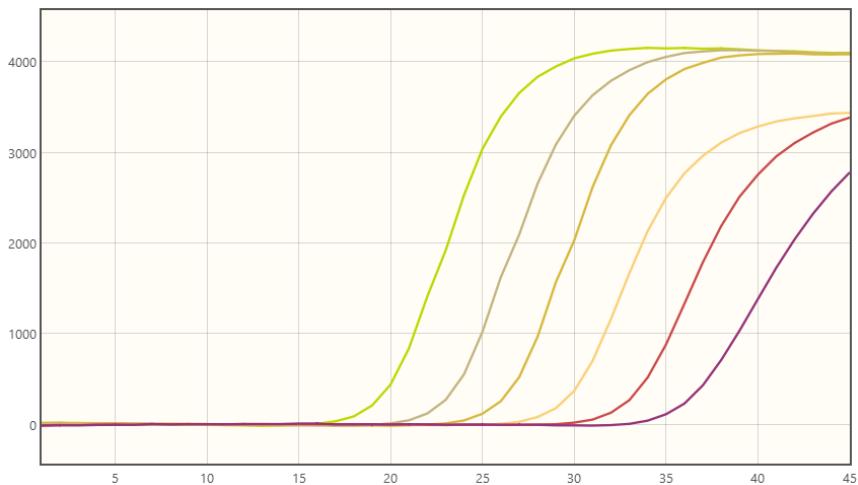


Figure 5. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

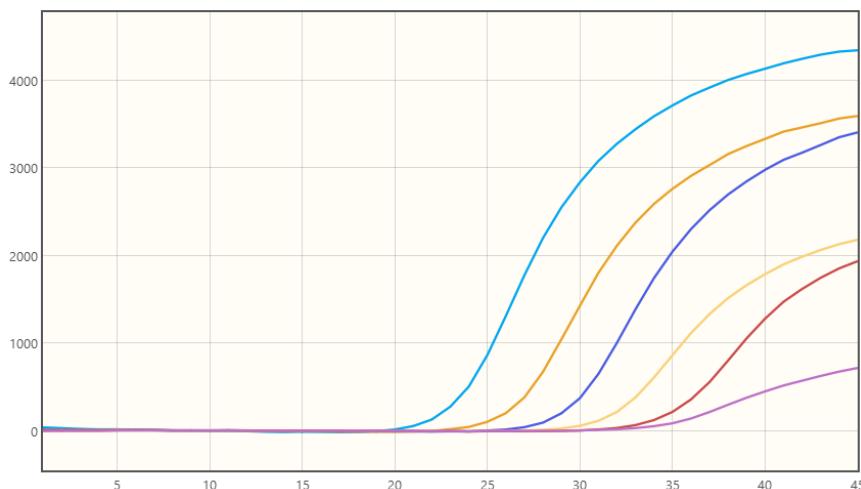
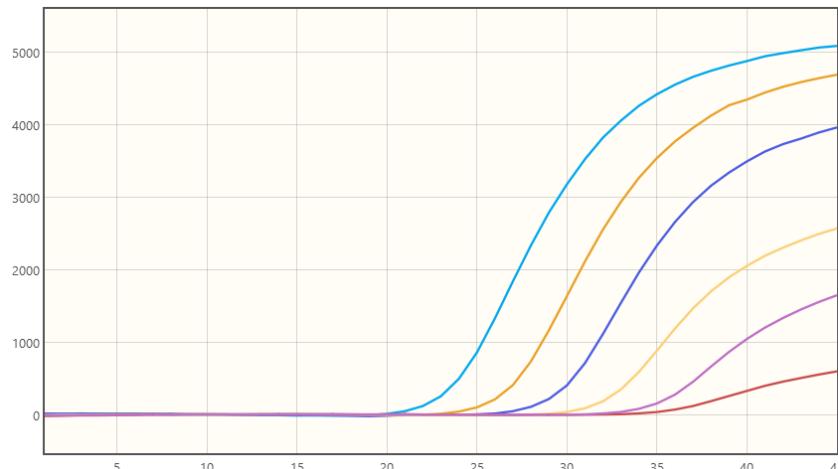


Figure 6. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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.



FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test RT-PCR automatisé en temps réel conçu pour la détection et la différenciation qualitatives de l'ARN des virus SARS-CoV-2, influenza A (grippe de type A), influenza B (grippe de type B) et/ou du virus respiratoire syncytial humain A et B (RSV) dans les échantillons respiratoires de personnes suspectées de COVID-19 ou d'une autre infection respiratoire par leur prestataire de santé. Ce test est destiné à faciliter l'identification de la présence de l'ARN viral du SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et/ou RSV. Le test utilise le BD MAX™ System pour l'extraction automatisée de l'ARN, puis la méthode RT-PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés avec des réactifs universels et consommables pour le BD MAX™ System. L'ARN est extrait des échantillons respiratoires, amplifié par RT-PCR, puis détecté au moyen de sondes fluorescentes à colorant rapporteur spécifiques pour le SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et/ou RSV.

2. Résumé et explication

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN de polarité positive non segmenté qui appartiennent à la famille des Coronaviridae. Six espèces de coronavirus sont connues pour causer des maladies chez l'homme. Quatre virus (229E, OC43, NL63 et HKU1) provoquent des symptômes de rhume courants et les deux autres [coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)] sont zoonotiques et entraînent des complications plus graves. SARS-CoV et MERS-CoV ont causé plus de 10 000 cas cumulés ces vingt dernières années, avec des taux de mortalité de 34 % pour MERS-CoV et de 10 % pour SARS-CoV.

En décembre 2019, des personnes qui travaillaient au marché de poissons de Huanan à Wuhan, province de Hubei, en Chine, ou qui habitaient à proximité, ont contracté une pneumonie d'origine inconnue. Une analyse approfondie du séquençage des échantillons respiratoires a révélé un nouveau coronavirus, appelé dans un premier temps le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV), puis SARS-CoV-2.

La transmission d'homme à homme du SARS-CoV-2 a été confirmée, même pendant la période d'incubation sans symptômes. Le virus provoque des pathologies respiratoires graves comme dans le cas du SARS-CoV. Bien que la pneumonie constitue la principale maladie associée, quelques patients ont développé une forme de pneumonie plus grave, un œdème pulmonaire, le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou une défaillance multiviscérale et sont décédés. Selon les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention ou CDC), les symptômes du SARS-CoV-2 peuvent se manifester dans les 2 jours et jusqu'à 14 jours après l'exposition, et sont, pour les plus fréquents : fièvre ou frissons, toux, fatigue, anorexie, myalgie et dyspnée, et pour les moins fréquents : mal de gorge, congestion nasale, maux de tête, diarrhée, nausées et vomissements. La perte de l'odorat (anosmie) ou la perte du goût (agueusie) précédant l'apparition des symptômes respiratoires a également été observée. Les personnes âgées et celles présentant des pathologies graves sous-jacentes, comme une maladie cardiaque ou pulmonaire ou le diabète, semblent courir un risque plus élevé de développer des complications plus graves liées à la COVID-19.



Le CDC recommande d'utiliser des échantillons provenant des voies respiratoires supérieures (écouvillons nasopharyngés [NP] et oropharyngés [OP], écouvillon du cornet nasal moyen, écouvillon nasal, lavage/aspiration nasopharyngé/e ou lavage/aspiration nasal/e [NW] prélevés principalement par un prestataire de santé) et/ou des voies respiratoires inférieures (expectorations, aspirat endotrachéal ou fluides de lavage bronchoalvéolaire chez les patients présentant une pathologie respiratoire plus grave) pour l'identification du SARS-CoV-2 et d'autres infections virales respiratoires, telles que l'influenza et le RSV.

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont responsables de la majorité des infections virales du tractus respiratoire inférieur. Les virus influenza de type A et B sont des causes importantes de morbidité et de mortalité dans le monde entier, dès lors que les personnes âgées et les personnes vulnérables sont particulièrement exposées au risque de développer une maladie et des complications graves comme une pneumonie. Les personnes atteintes ressentent certains ou tous les symptômes suivants : fièvre ou état fébrile/frissons, toux, mal de gorge, congestion nasale et écoulement nasal, myalgie, migraines et anorexie. Les virus de l'influenza se transmettent d'une personne à une autre de deux manières : par voie aérienne (grosses gouttelettes et aérosols générés par les éternuements et la toux) et par contact direct ou indirect.

Les virus influenza de type A et B sont des virus enveloppés portant un génome composé de huit segments d'ARN monocaténaire codant pour 11 ou 12 protéines virales. L'enveloppe virale, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte, est constituée d'une bicouche lipidique contenant des protéines transmembranaires, comme l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), ainsi que des protéines matricielles M1 et M2. Les virus influenza de type A sont en outre classés en sous-types en fonction de l'antigénicité de leurs molécules « HA » et « NA », tandis que l'influenza de type B est divisée en 2 lignées antigéniquement et génétiquement distinctes, Victoria et Yamagata.

Les virus respiratoires syncytiaux humains A et B (RSV) appartiennent à la famille des *Paramyxoviridae* et sont les agents vitaux les plus importants des infections respiratoires aiguës. Le RSV est un virus enveloppé portant un génome à ARN linéaire monocaténaire de polarité négative, non segmenté. Le virus respiratoire syncytial est un facteur déclencheur fréquent d'infections respiratoires responsables de bronchites, pneumonies et infections pulmonaires obstructives chroniques chez les sujets de tout âge. Les personnes atteintes ressentent souvent certains ou tous les symptômes suivants : rhinorrhée, fièvre légère, toux, mal de gorge, maux de tête et respiration sifflante. Le RSV se transmet par l'entremise de grosses gouttelettes de sécrétion nasopharyngée provenant de personnes infectées, par contact étroit ou par auto-inoculation après avoir touché des surfaces contaminées.

Le diagnostic peut être problématique dans la mesure où un grand nombre d'agents pathogènes peuvent causer des infections respiratoires aiguës présentant des syndromes cliniques similaires. Les tests PCR en temps réel se sont avérés un outil de diagnostic sensible et spécifique pour la détection des virus SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et RSV.

3. Procédé

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est conçu pour l'identification des virus SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et/ou RSV dans des échantillons respiratoires. La détection se fait en une seule étape par RT-PCR en temps réel au cours de laquelle la transcription inverse et



l'amplification ultérieure de la séquence cible spécifique se produisent dans le même tube réactionnel. La cible ARN isolée est transcrrite, générant de l'ADN complémentaire par transcriptase inverse qui est suivie par l'amplification de deux zones conservées du gène N (N1 et N2) pour SARS-CoV-2, d'une zone conservée pour le gène M1 pour influenza A et influenza B, et d'une zone conservée pour le gène N pour le RSV au moyen d'amorces spécifiques et de sondes marquées d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le BD MAX™ System.

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est constitué de deux tubes réactionnels distincts. Tandis que l'un détecte et différencie l'ARN des virus influenza A, influenza B et/ou RSV (opercule rouge transparent ou 1A), l'autre détecte spécifiquement l'ARN du SARS-CoV-2 (opercule vert transparent ou 1G). Chaque tube contient tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon, polymérase, transcriptase inverse) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne (endogène dans le SARS-CoV-2 reaction tube) pour surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase. Le test SARS-CoV-2 utilise un gène domestique humain comme contrôle interne endogène (CI (gène RNase P humain). Les gènes domestiques humains sont impliqués dans la maintenance des cellules de base et, par conséquent, sont censés être présents dans toutes les cellules humaines nucléées et maintenir des niveaux d'expression relativement constants. Chaque cible ARN est amplifiée et détectée dans des canaux spécifiques (475/520, 585/630 et/ou 630/665) et le contrôle interne (CI) dans le canal 530/565. Dans le test influenza A, influenza B et/ou RSV, la cible ARN de l'influenza A est amplifiée et détectée dans le canal 475/520, celle de l'influenza B dans le canal 585/630, celle du RSV dans le canal 630/665 et le contrôle interne (CI) de ce test dans le canal 530/565. Dans le test du SARS-CoV-2, la cible génétique N2 est amplifiée et détectée dans le canal 475/520, la cible N1 dans le canal 630/665 et le contrôle interne (CI) endogène dans le canal 530/565.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 1 ci-après.



Référence	Réactif/matériau	Description	Couleur/code-barres	Quantité
VS-ABR212R	Flu A, Flu B & RSV reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne dans un format stabilisé	Obercule rouge transparent ou 1A	2 poches de 12 tubes
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne endogène dans un format stabilisé	Obercule vert transparent ou 1G	2 poches de 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Obercule orange transparent ou 11	1 poche de 24 tubes

Tableau 1. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, réf. n° VS-FNR124 (444217).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement qui sont indispensables, mais qui ne sont pas inclus dans le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR en temps réel : BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (réf. :442827 ou 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (réf. : 437519)
- Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.
- La durée d'utilisation des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels est de 28 jours maximum après ouverture.

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.



- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le BD MAX™ System ne sont pas contaminés. Évitez à tout moment tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches.
- Veillez à utiliser un tube pour déterminer l'ARN de l'influenza A, de l'influenza-B et du RSV au Snap-In 2 (position verte) et un autre tube pour déterminer l'ARN du SARS-CoV-2 au Snap-In 4 (position bleue). Assurez-vous de ne pas les mélanger tout au long du processus.
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, boire ou fumer dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et matériau ayant été exposé à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le stockage, le traitement et l'élimination des échantillons.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Consultez le manuel de l'utilisation du système BD MAX™ pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.



8. Procédure

8.1. PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été validé sur un écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un milieu de transport viral (VTM) (Vircell S.L., Espagne).

Tout autre type d'échantillon provenant d'écouvillons nasopharyngés/oropharyngés dans un VTM doit être validé par l'utilisateur.

Les échantillons prélevés, stockés et transportés doivent être conservés selon les conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 48 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 48 heures), nous recommandons une expédition à ≤-20 °C. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 48 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

8.2. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET EXTRACTION DE L'ARN

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Veuillez noter qu'un prétraitement peut s'avérer nécessaire pour certains échantillons. L'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application.

1. Pipettez 400 µl de l'écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un milieu de transport viral (VTM) dans un BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le système BD MAX™.

Remarque : le Flu A, Flu B & RSV reaction tube a été validé avec un échantillon de 200-400 µl et le SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube avec un échantillon de 400-750 µl.

8.3. PROTOCOLE PCR

Remarque : veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™ pour obtenir des instructions détaillées.

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Remarque : si vous avez déjà créé le test VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.



- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : notamment, VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2, FluA+B,RSV).
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 950 µl.
- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure et disposez de tubes à clipser (snap-in) avec opercule à code-barres, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes-barres personnalisés) :
 - a. Code-barres Snap-In 2 : 1A (pour le Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
 - b. Code-barres Snap-In 3 : 11 (pour le Rehydration Buffer tube)
 - c. Code-barres Snap-In 4 : 1G (pour le SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) Les « PCR Settings » (Réglages PCR) et les « Test Steps » (Étapes de test) doivent être effectués pour les positions Snap-In 2 (vert) et Snap-In 4 (bleu).
- 10) Snap-In 2 (vert). Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 2).

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

Tableau 2. Réglages PCR.

Remarque : il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

- 11) Snap-In 2 (vert). Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 3) suivants :



		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)				
Channel (Canal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	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	-

Tableau 3. Paramètres crosstalk spectraux.

12) Snap-In 2 (vert). Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 4).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps)	Température (Température)	Detect (Détection)
Reverse transcription (Transcription inverse)	Maintien	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension (Collecte de données))	2- température	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tableau 4. Protocole PCR.

13) Snap-In 4 (bleu). Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 5).

Channel (Canal)	Alias (Pseudo)	Gain (Gain)	Threshold (Seuil)	Ct Min (Ct min.)	Ct Max (Ct max.)
475/520 (FAM)	Cible SARS-CoV-2 N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Cl endogène	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	Cible SARS-CoV-2 N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tableau 5. Réglages PCR.

Remarque : il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

14) Snap-In 4 (bleu). Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 6) suivants :



		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)				
Channel (Canal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	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	-

Tableau 6. Paramètres crosstalk spectraux.

15) Snap-In 4 (bleu). Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 7).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps)	Température (Température)	Detect (Détection)
Reverse transcription (Transcription inverse)	Maintien	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension (Collecte de données))	2-température	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tableau 7. Protocole PCR.

16) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).

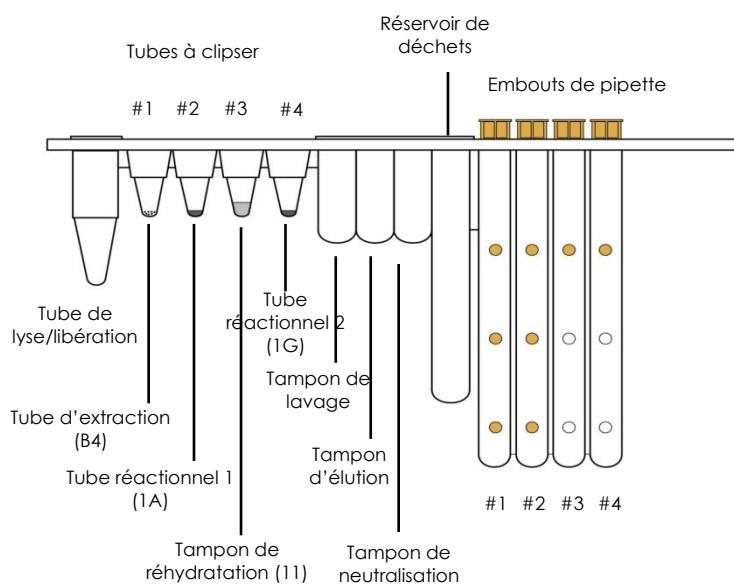
8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- Prenez une barrette unitaire de réactifs du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond du tube et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du système BD MAX™.
- Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- Déterminez et séparez le nombre approprié de Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (opercule rouge ou 1A) et clippez-les dans leur position correspondante sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir - voir figure 1).
 - Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.



- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer tubes (opercule orange ou 11) et clipsez-les dans leur position correspondante sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
- 5) Déterminez et séparez le nombre approprié de SARS-CoV-2 ($N_1 + N_2$) reaction tubes (opercule vert ou 1G) et clippez-les dans leur position correspondante sur la barrette (clip position 4, code couleur vert sur le portoir – voir figure 1).
- Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA barrette réactive (TNA) du kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du système BD MAX™ (logiciel v4.50A ou supérieur).
- Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VSARSCoV2, FluA+B,RSV (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- Saisissez le numéro d'identification du tube de tampon d'échantillon dans la fenêtre Tube d'échantillon de la « Worklist » (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la « Worklist » (Liste de travail) et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les tubes de



tampon d'échantillon soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les tubes de tampon d'échantillon sont correctement appariés.

- 6) Placez le tube de tampon d'échantillon préparé dans le(s) portoir(s) du système BD MAX™.
- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™ (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de PCR BD MAX™ Cartridge(s) dans le système BD MAX™.
- 9) Fermez la porte du système BD MAX™.
- 10) Cliquez sur « Start Run » (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.5 Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquez sur la touche « Results » (Résultats).
- 2) Faites un double-clic sur votre programme dans la liste ou appuyez sur la touche « View » (Aperçu).
- 3) Cliquez sur « Print » (Imprimer), sélectionnez : « Run Details, Test Details and Plot... » (Détails du programme, détails du test et trame...)
- 4) Cliquez sur la touche « Print or Export » (Imprimer ou Exporter) sur l'écran « Run Reports » (Produire des rapports).

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser les données, veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAX™ selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs Ct et les courbes d'amplification pour chaque canal détecteur de chaque échantillon testé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 2). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans les tableaux 8 et 9.

Vérifiez le signal du contrôle interne pour vous assurer du fonctionnement correct du mélange d'amplification. Vérifiez en outre qu'il n'y a pas de rapport de défaillance du système BD MAX™.

Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide des tableaux suivants :

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



Influenza A (475/520)	Influenza B (585/630)	RSV (630/665)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
+	+	+	+/- ¹	ARN influenza A, influenza B et RSV détecté ¹
+	-	-	+/- ¹	ARN influenza A détecté, ARN influenza B et RSV non détecté ¹
+	+	-	+/- ¹	ARN influenza A et influenza B détecté, ARN RSV non détecté ¹
+	-	+	+/- ¹	ARN influenza A et RSV détecté, ARN influenza B non détecté ¹
-	+	-	+/- ¹	ARN influenza B détecté, ARN influenza A et RSV non détecté ¹
-	+	+	+/- ¹	ARN influenza B et RSV détecté, ARN influenza A non détecté ¹
-	-	+	+/- ¹	ARN RSV détecté, ARN influenza A et influenza B non détecté ¹
-	-	-	+ ²	ARN influenza A, influenza B et RSV non détecté ²
-	-	-	- ²	Résultat non résolu (UNR, Unresolved result) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu avec le traitement de l'échantillon et/ou les étapes d'amplification. ²
IND	IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 8. Interprétation échantillon Flu A, Flu B & RSV reaction tube

+ : l'amplification a eu lieu

- : l'amplification n'a pas eu lieu

1 Un échantillon est jugé positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne peut afficher ou non un signal d'amplification parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible au lieu du contrôle interne. Dans ce cas, la détection du CI n'est pas nécessaire.

2 Un échantillon est jugé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection et si le contrôle interne est positif (valeur Ct inférieure à 40). L'inhibition de la réaction polymérase peut être exclue par l'amplification du contrôle interne. En cas de résultats non résolus (UNR, unresolved result), d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, il est recommandé de recommencer le test.

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



SARS-CoV-2 (cible N2) (475/520)	Contrôle interne endogène (530/565)	SARS-CoV-2 (cible N1) (630/665)	Interprétation
+	+/- ³	+	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté³
+ ⁴	+/- ³	-	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté^{3,4}
-	+ ⁵	-	ARN du gène N du SARS-CoV-2 non détecté⁵
-	- ⁵	-	Résultat non résolu (UNR, Unresolved result) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu avec le traitement de l'échantillon et/ou les étapes d'amplification. ⁵
IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 9. Interprétation échantillon SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+ : l'amplification a eu lieu

- : l'amplification n'a pas eu lieu

3 Un échantillon est jugé positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne (CI) endogène peut afficher ou non un signal d'amplification. Parfois, la détection par CI ne s'avère pas nécessaire parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible.

4 Si un seul site cible du gène N s'amplifie, vérifiez la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence. En cas de doute sur l'interprétation, il est également recommandé, selon le matériau disponible, de procéder comme suit :

- extraire une autre aliquote du même spécimen (accroître si possible le volume d'échantillon à 750 µl) et procéder à un nouveau test ou
- obtenir un nouveau spécimen et procéder à un nouveau test.

5 Dans le cas de sites cibles négatifs pour le SARS-CoV-2, l'IC doit afficher un signal d'amplification avec une valeur CT inférieure à 35. La valeur CT peut s'avérer très variable dès lors que le contrôle interne endogène est un gène domestique humain qui devrait être présent dans toutes les cellules nucléées humaines de l'échantillon d'origine. En l'absence de signal ou en cas de valeur Ct ≥ 35 du contrôle interne endogène, le résultat est jugé « non résolu » et un nouveau test est exigé.

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi, le processus d'extraction mis en œuvre par l'utilisateur, de vérifier la bonne exécution de chaque étape du RT-qPCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.



Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec un écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un VTM.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons respiratoires.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par le SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et/ou RSV, soit par des échantillons contenant de fortes concentrations de l'ARN cible, soit à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- Les combinaisons d'amorces et de sondes spécifiques pour la détection de zones conservées du gène N (SARS-CoV-2) utilisées dans le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été conçues sur la base du test CDC États-Unis pour la détection spécifique du SARS-CoV-2 par l'amplification de deux zones uniques du gène N. Elles ne présentent pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine, le SARS-CoV ou d'autres coronavirus, lesquelles pourraient entraîner des faux positifs prévisibles.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ARN).
 - La dégradation de l'ARN viral durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variantes nouvelles ou inconnues de SARS-CoV-2, influenza et/ou RSV.
 - Une charge virale dans l'échantillon inférieure à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Dans le SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube, une amplification d'un site cible unique voire des résultats positifs aléatoires suggèrent un rendement d'amplification légèrement différent du site cible du gène N. Les



échantillons présentant une faible charge virale peuvent entraîner une amplification de cible unique de N. En cas de doute, il est recommandé de se référer à un laboratoire de référence pour des tests supplémentaires.

- Il est possible que certains échantillons (dans le SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube) ne présentent pas de courbes d'amplification du RNase P en raison du faible nombre de cellules humaines dans l'échantillon clinique d'origine. Un signal CI négatif n'exclut pas la présence de l'ARN du SARS-CoV-2, de l'influenza et/ou du RSV dans un échantillon clinique.
- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de virus viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences virales cibles.
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2, l'influenza et/ou le RSV et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Les types d'échantillons et le moment optimaux pour les pics de concentration virale pendant les infections causées par le SARS-CoV-2 et la nouvelle souche d'influenza A n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons (types et moments) sur un même patient peut s'avérer nécessaire pour détecter le virus.
- Si les tests de diagnostic d'autres maladies respiratoires sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent que l'infection par le SARS-CoV-2, l'influenza et/ou le RSV est possible, il convient alors d'envisager un résultat faux négatif et de discuter d'un nouveau test pour le patient.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient un contrôle interne (CI) dans chaque Flu A, Flu B & RSV reaction tube et un contrôle interne endogène dans chaque SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube qui confirment la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testée individuellement dans chaque tube réactionnel.

La performance clinique du Flu A, Flu B & RSV reaction tube a été testée au moyen de 344 échantillons respiratoires (écouvillons oropharyngés) provenant de patients symptomatiques. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus avec une méthode de détection moléculaire [cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)].

Les résultats étaient les suivants :



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

Tableau 10. Résultats comparatifs influenza A.

Le pourcentage de concordance positif est >96 % et le pourcentage de concordance négatif est >99 %.

*La faible quantité de matrice ARN dans cet échantillon respiratoire est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.

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

Tableau 11. Résultats comparatifs influenza B.

Le pourcentage de concordance positif est >99 % et le pourcentage de concordance négatif est >98 %.

*La faible quantité de matrice ARN dans cet échantillon respiratoire est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.

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

Tableau 12. Résultats comparatifs RSV.

Le pourcentage de concordance positif est >88 % et le pourcentage de concordance négatif est >99 %.

*La faible quantité de matrice ARN dans cet échantillon respiratoire est inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée.



La performance clinique du SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube a été testée au moyen de 254 échantillons respiratoires (écouvillons nasopharyngés dans un milieu de transport Vircell) provenant de patients avec une suspicion clinique de la maladie COVID-19 ou d'autres maladies respiratoires similaires. Les résultats ont été comparés à ceux issus du diagnostic clinique réalisé par test Simplexa™ COVID-19 Direct avec analyse contradictoire selon le protocole de la Charité.

SARS-CoV-2 (<i>N1 + N2</i>) reaction tube	Autres tests RT-PCR			
		+	-	Total
	+	63	2*	65
	-	0	189	189
Total		63	191	254

Tableau 13. Résultats comparatifs SARS-CoV-2.

*Le diagnostic initial de l'un des deux échantillons n'était pas valide et a été signalé comme positif au patient à des fins de prévention et de période de quarantaine.

Le SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube a détecté deux échantillons positifs qui n'avaient pas été identifiés par le test Simplexa™ COVID-19 Direct et le protocole de la Charité.

Le pourcentage de concordance positif (PCP) et le pourcentage de concordance négatif (PCN) pour le SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) reaction tube sont >99 % et 98 %, respectivement.

Les résultats montrent une concordance élevée pour la détection de SARS-CoV-2, influenza A, influenza B et/ou RSV avec le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection ≥ 10 copies génomiques par réaction pour le virus influenza A, ≥ 20 copies génomiques par réaction pour le virus influenza B, ≥ 2 copies génomiques par réaction pour le RSV et ≥ 5 copies génomiques par réaction pour le SARS-CoV-2 avec un taux positif $\geq 95\%$ (figures 2, 3, 4, 5 et 6).



Figure 2. Dilution en série de l'influenza A (2×10^6 - 2×10^1 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

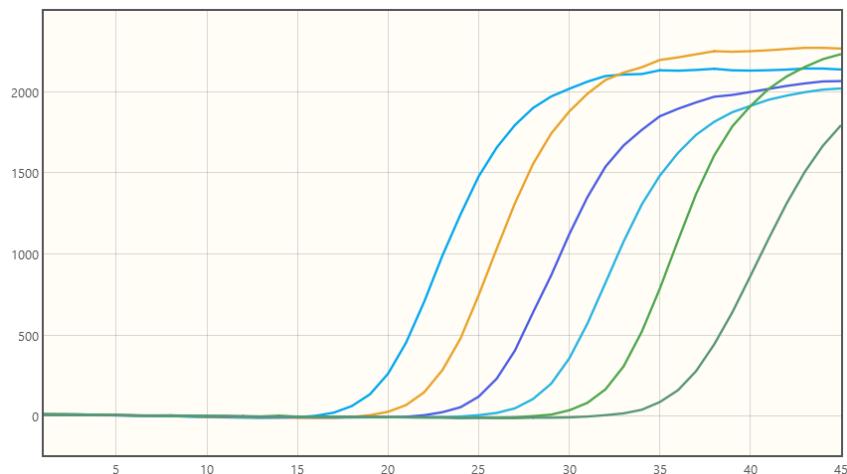


Figure 3. Dilution en série de l'influenza B (2×10^6 - 2×10^1 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

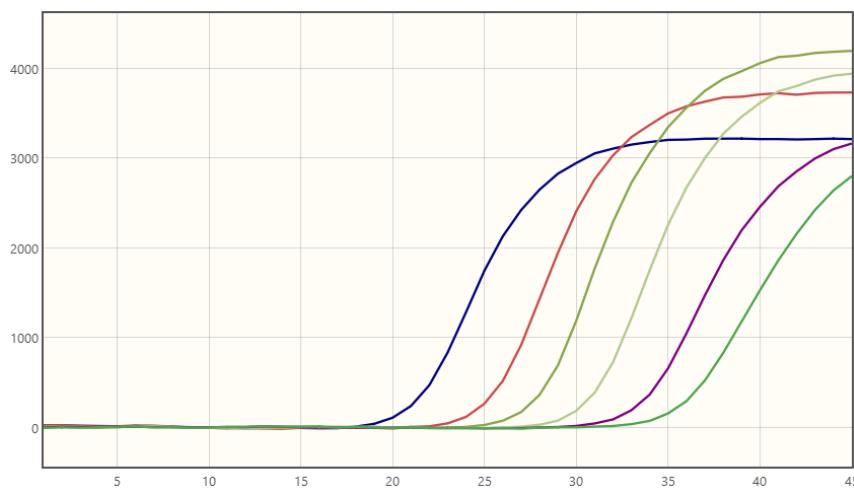


Figure 4. Dilution en série du RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [Cy5]).

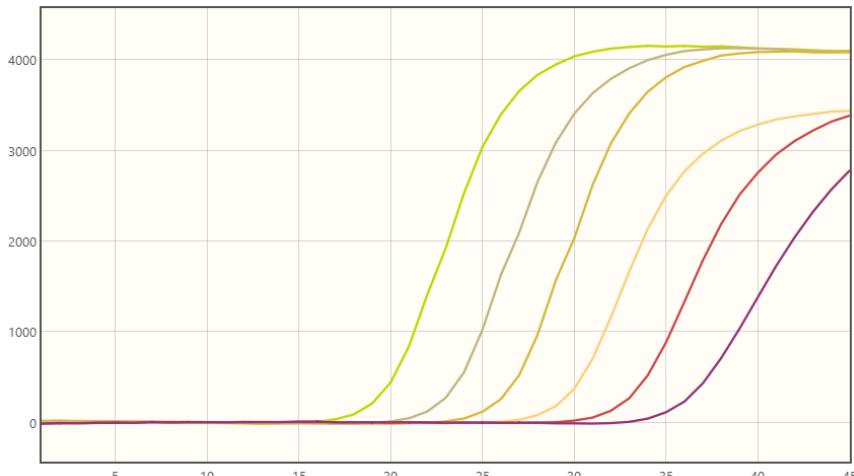


Figure 5. Dilution en série du SARS-CoV-2 ($N_1 + N_2$) ($9.9 \times 10^4 - 9.9 \times 10^0$ et 5.0×10^0 copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

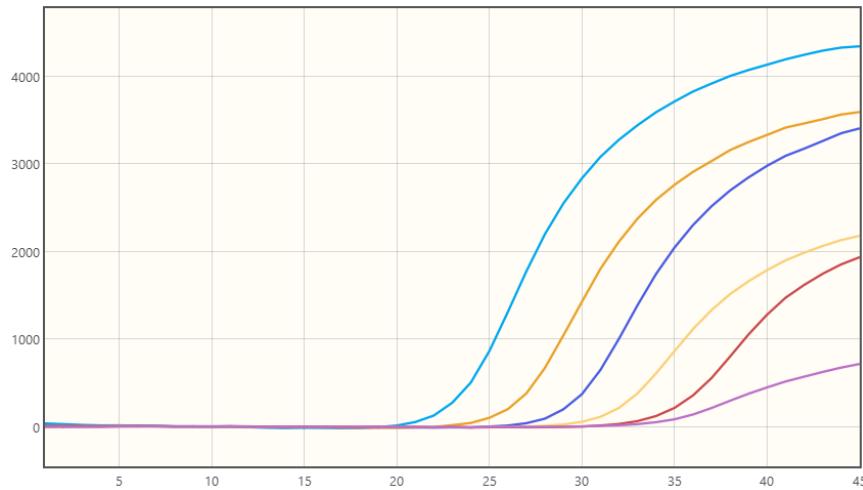
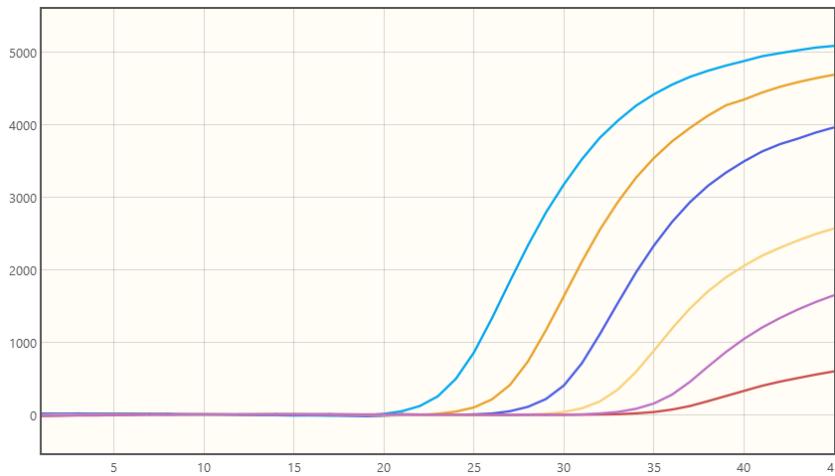
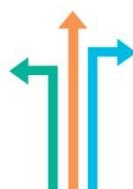


Figure 6. Dilution en série du SARS-CoV-2 ($N_1 + N_2$) ($9.9 \times 10^4 - 9.9 \times 10^0$ et 5.0×10^0 copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [Cy5]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test ciblant la présence du SARS-CoV-2, influenza (A+B) et RSV a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les agents pathogènes des voies respiratoires les plus courants. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre l'un quelconque des microorganismes testés suivants, à l'exception des agents pathogènes propres à chaque test :



Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Virus influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a)	-/+	Virus influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)	-/+
Bocavirus	-	Virus influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a)	-/+	Virus influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)	-/+
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)	-/+
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus influenza A/New York/39/2012 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26	-/+
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Brisbane/60/2008	-/+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Colorado/6/2017	-/+
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Malaysia/2506/2004	-/+
Génotype <i>Chlamydia psittaci</i> A et C	-	Virus influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Maryland/15/2016	-/+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Netherlands/207/06	-/+
Coronavirus humain 229E, OC43, NL63 et HKU1	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A)	-/+
Coronavirus MERS	-	Virus influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Nevada/3/2011	-/+
Souche coronavirus SARS Francfort 1	-	Virus influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	-/+	Virus influenza B/New Jersey/1/2012	-/+
Souche SARS-CoV-2 BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-/+	Virus influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C)	-/+	Virus influenza B/Texas/02/2013	-/+
Souche SARS-CoV-2 2019-nCoV/Italy-INMI1	-/+	Virus influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)	-/+	Virus influenza B/Townsville/8/2016	-/+
SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020	-/+	Virus influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Canberra/11/2016	-/+
SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	-/+	Virus influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)	-/+	Virus influenza B/Florida/4/2006	-/+
Souche SARS-CoV-2 2019nCoV/USA/VA1/2020	-/+	Virus influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)	-/+	Virus influenza B/Florida/07/2004	-/+
Entérovirus 68 et 71	-	Virus influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)	-/+	Virus influenza B/Guangdong/120/2000	-/+
Entérovirus échovirus 11 et 30	-	Virus influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)	-/+	Virus influenza B/Hubei Wujiaogang/158/2009 (NYMC BX-39)	-/+



Test de réactivité croisée					
Entérovirus coxsackievirus A24, A9 et B3	-	Virus influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)	-/+	Virus influenza B/ Jiangsu/10/2003	-/+
Haemophilus influenzae MinnA	-	Virus 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 (clade 6B.1)	-/+	Virus influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)	-/+	Legionella bozemanii	-
Virus influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-/+	Virus influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29	-/+	Legionella dumoffii	-
Virus influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	-/+	Virus influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	-/+	Legionella longbeachae	-
Virus influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-/+	Virus influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30	-/+	Legionella micdadei	-
Virus influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Virus influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1)	-/+	Legionella pneumophila	-
Virus influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Virus influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)	-/+	Métapneumovirus humain A et B	-
Virus influenza A/PR/8/34 (H1N1)	-/+	Virus influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	-/+	Moraxella catarrhalis	-
Virus influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)	-/+	Mycoplasma pneumoniae	-
Virus influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)	-/+	Mycobacterium tuberculosis non résistant à la rifampine	-
Virus influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)	-/+	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
Virus influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)	-/+	Virus influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	-/+	Pneumocystis jirovecii type A1 et g885652	-



Test de réactivité croisée					
Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)	-/+	Rhinovirus humain type C	-
Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4)	-/+	Staphylococcus aureus subsp. aureus	-
Virus influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v	-/+	Virus influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	-/+	Staphylococcus epidermidis	-
Virus influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v	-/+	Virus influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)	-/+	Streptococcus pneumoniae Z022	-
Virus influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	-/+	Streptococcus pyogenes	-
Virus influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)	-/+	Streptococcus salivarius	-
Virus influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)	-/+	Virus influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	-/+	Virus respiratoire syncytial (RSV) A et B (souche CH93(18)-18)	-/+
Virus influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v	-/+	Virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-/+	Virus respiratoire syncytial humain souche longue	-/+
Virus influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v	-/+	Virus influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)	-/+		

Tableau 14. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique

La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour le **SARS-CoV-2** a été évaluée par rapport à l'ARN d'une souche de 2019-nCoV humaine BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, d'une souche de 2019-nCoV humaine 2019-nCoV/Italy-INMI1, d'une souche de SARS-CoV-2 2019nCoV/USA-WA1/2020, des contrôles par ARN synthétique pour deux variantes du virus SARS-CoV-2 : MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) et MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), montrant un résultat positif.

La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour l'**influenza A** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait des souches virales suivantes : influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09, influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09, influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09, influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09, influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1), influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1), influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09, influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09, influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09, influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09, influenza A/PR/8/34 (H1N1), influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2), influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2), influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2), influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2), influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), influenza A/Hong



Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v, influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v, influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2), influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2), influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2), influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v, influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v, influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a), influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a), influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2), influenza A/New York/39/2012 (H3N2), influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2), influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2), influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2), influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2), influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), influenza A/Texas/50/2012 (H3N2), influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1), influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C), influenza A/Victoria/210/2009(H3N2), influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2), influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2), influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1), influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IDCDC-RG6 (H5N1), influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1), influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1), influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a, influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1), influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1), influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1), influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1), influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1), influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1), influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29, influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30, influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IDCDC-RG7 (H5N1), influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1), influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1), influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IDCDC-RG (H5N1), influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1), influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IDCDC-4, influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3), influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4), influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8), influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8), influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IDCDC-5 (H7N2), influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9), influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9), influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IDCDC-2 (H9N2), influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2), influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26, montrant un résultat positif.

La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour l'**influenza B** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait des souches virales suivantes : influenza B/Brisbane/60/2008, influenza B/Colorado/6/2017, influenza B/Malaysia/2506/2004, influenza B/Maryland/15/2016, influenza B/Netherlands/207/06, influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A), influenza B/Nevada/3/2011, influenza B/New Jersey/1/2012, influenza B/Texas/02/2013, influenza B/Townsville/8/2016 (**B/lignée Victoria**) ; influenza B/Canberra/11/2016, influenza B/Florida/4/2006, influenza B/Florida/07/2004, influenza B/Guangdong/120/2000 , influenza B/Hubei Wujigang/158/2009 (NYMC BX-39), influenza B/Jiangsu/10/2003, influenza B/Massachusetts/2/2012, influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3), influenza B/Phuket/3073/2013, influenza B/Texas/06/2011, influenza B/Wisconsin/1/2010, influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A (**B/lignée Yamagata**), montrant un résultat positif.

La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour le **RSV** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait du RSV A et B (souche CH93 (18)-18) et du virus respiratoire syncytial humain souche longue, montrant un résultat positif.

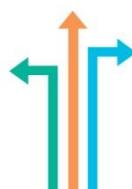


13. Bibliography/Bibliographie

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.

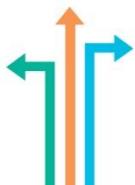


14. Symbols for IVD components and reagents/Symboles pour les composants IVD et réactifs

IVD	<i>In vitro diagnostic device</i> Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>		Keep dry Conserver dans un endroit sec		Use by Utiliser avant		Manufacturer Fabricant	LOT	Batch code (Lot) Numéro de lot
	Consult Instructions for Use Consulter les consignes d'utilisation		Temperature limitation Limitation de température		Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)	DIL	Sample diluent Diluant d'échantillon	REF	Catalognumber Numéro de catalogue

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