

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest  
BIOTEC

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

Handbook for the following references/

Podręcznik dotyczy urządzeń z poniższymi kodami:

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

do stosowania razem z systemem BD MAX™



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

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

Diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. Real-time PCR assays have been shown to be a sensitive and specific diagnostic tool for the detection of SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and RSV viruses.

### 3. Principle of the procedure

VIASURE 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                |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <b>VS-ABR212R</b> | 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 |
| <b>VS-NCO312</b>  | 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 |
| <b>VS-RB09</b>    | 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 indented 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.



|                    | Channel | False Receiving 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.





|                    | Channel | False Receiving 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

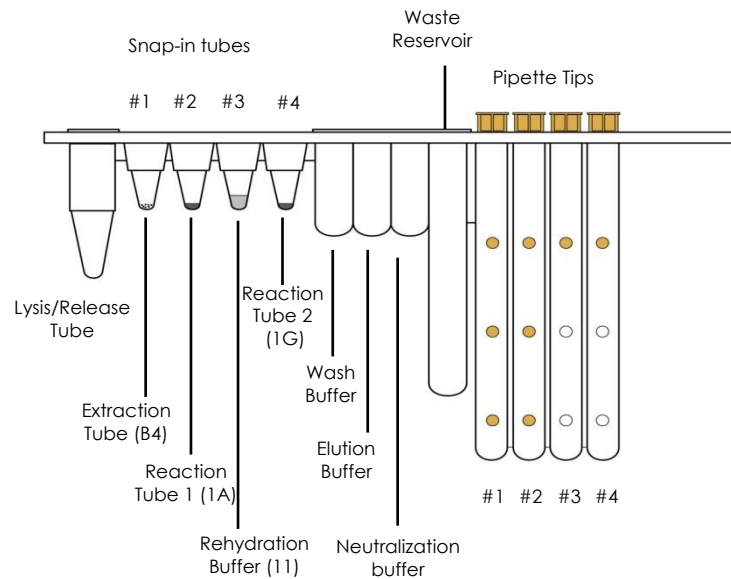
- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction 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).

  - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
  - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.

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



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VSARSCoV2,FluA+B,RSV (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID 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.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.



### 8.3.4 BD MAX™ report

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

## 9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 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<br>(475/520) | Flu B<br>(585/630) | RSV<br>(630/665) | Internal<br>control<br>(530/565) | Interpretation                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------|--------------------|------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +                  | +                  | +                | +/-1                             | Flu A, Flu B and RSV RNA Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                                          |
| +                  | -                  | -                | +/-1                             | Flu A RNA Detected, Flu B and RSV RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                         |
| +                  | +                  | -                | +/-1                             | Flu A and Flu B RNA Detected, and RSV RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                     |
| +                  | -                  | +                | +/-1                             | Flu A and RSV RNA Detected, and Flu B RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                     |
| -                  | +                  | -                | +/-1                             | Flu B RNA Detected, Flu A and RSV RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                         |
| -                  | +                  | +                | +/-1                             | Flu B and RSV RNA Detected, Flu A RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                         |
| -                  | -                  | +                | +/-1                             | RSV RNA Detected, Flu A and Flu B RNA Not Detected <sup>1</sup>                                                                                                                                                         |
| -                  | -                  | -                | + <sup>2</sup>                   | Flu A, Flu B and RSV RNA Not Detected <sup>2</sup>                                                                                                                                                                      |
| -                  | -                  | -                | - <sup>2</sup>                   | 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. <sup>2</sup> |
| 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                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +                                | +/- <sup>3</sup>                      | +                                | SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>3</sup>                                                                                                                                                                             |
| + <sup>4</sup>                   | +/- <sup>3</sup>                      | -                                | SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>3,4</sup>                                                                                                                                                                           |
| -                                | +/- <sup>3</sup>                      | + <sup>4</sup>                   | SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>3,4</sup>                                                                                                                                                                           |
| -                                | + <sup>5</sup>                        | -                                | SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected <sup>5</sup>                                                                                                                                                                         |
| -                                | - <sup>5</sup>                        | -                                | 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. <sup>5</sup> |
| 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  $\geq 35$  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 Viracell 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  $\geq 10$  genome copies per reaction for Flu A,  $\geq 20$  genome copies per reaction for Flu B,  $\geq 2$  genome copies per reaction for RSV and  $\geq 5$  genome copies per reaction for SARS-CoV-2 with a positive rate of  $\geq 95\%$  (Figures 2, 3, 4, 5 and 6).

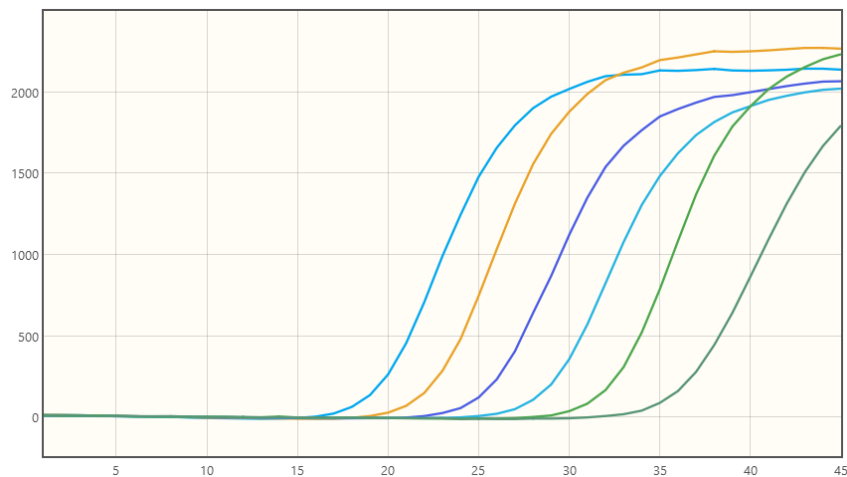
Figure 2. Dilution series of Flu A ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^1$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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

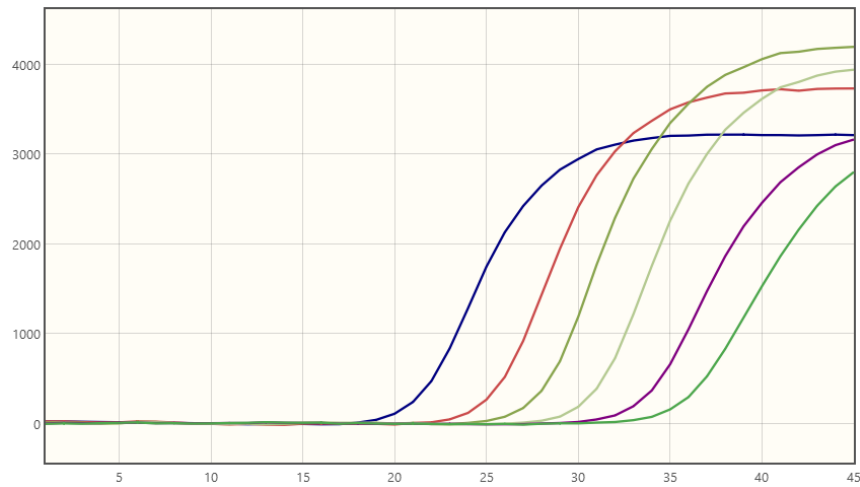


Figure 4. Dilution series of RSV ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^1$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

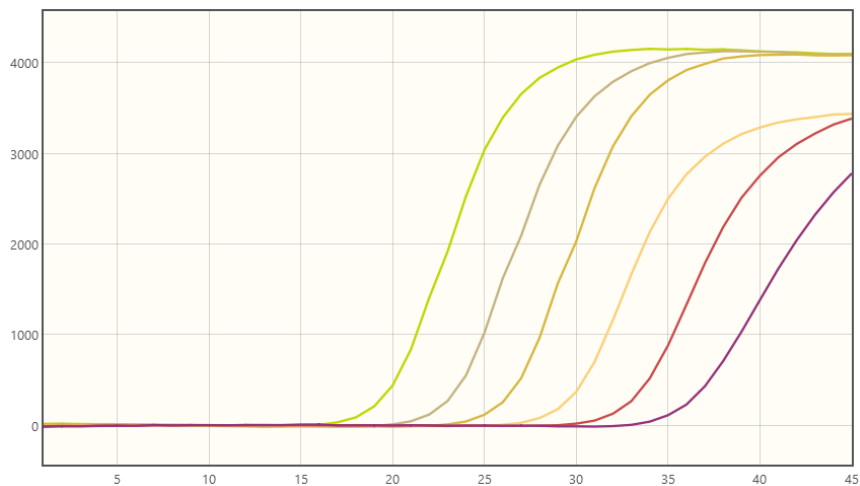


Figure 5. Dilution series of SARS-CoV-2 ( $N1 + N2$ ) ( $9.9 \times 10^4$ - $9.9 \times 10^0$  and  $5.0 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

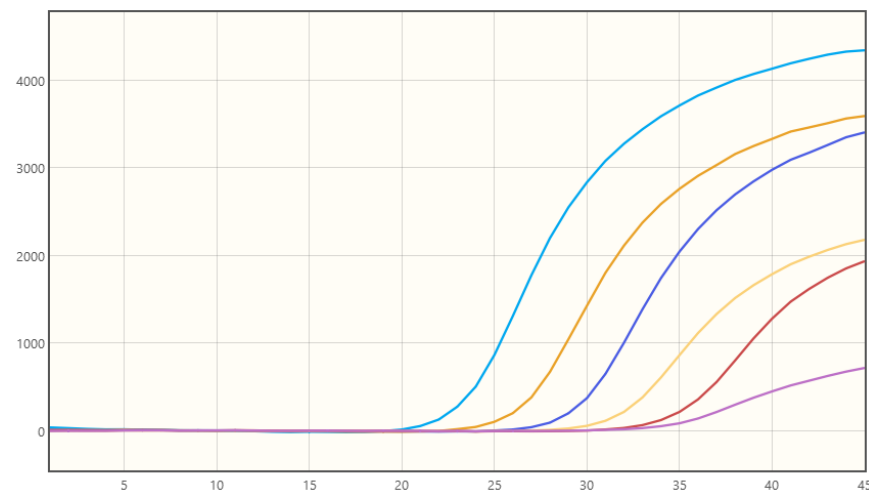
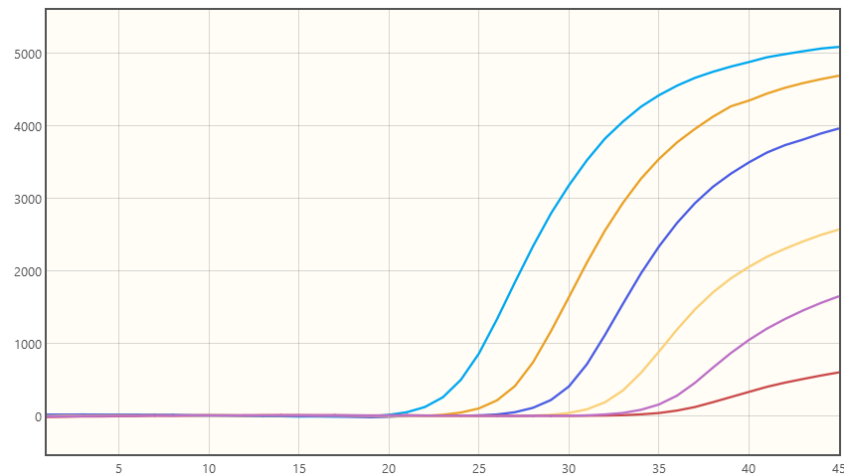


Figure 6. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9.9 \times 10^4$ - $9.9 \times 10^0$  and  $5.0 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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

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



| Cross-reactivity testing                                     |     |                                                                    |         |                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------|-----|
| Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus | -/+ | Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IBCDRCG30 virus              | -<br>/+ | <i>Legionella micdadei</i>                                     | -   |
| Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus                | -/+ | Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus             | -<br>/+ | <i>Legionella pneumophila</i>                                  | -   |
| Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus             | -/+ | Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus    | -<br>/+ | Human metapneumovirus A and B                                  | -   |
| Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus                             | -/+ | Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus                         | -<br>/+ | <i>Moraxella catarrhalis</i>                                   | -   |
| Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus                   | -/+ | Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus              | -<br>/+ | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                                   | -   |
| Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus                  | -/+ | Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus          | -<br>/+ | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant       | -   |
| Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus                     | -/+ | Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus                     | -<br>/+ | 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 | -<br>/+ | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652              | -   |
| Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus                 | -/+ | Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus                | -<br>/+ | 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      | -<br>/+ | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>              | -   |
| Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus                     | -/+ | Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus              | -<br>/+ | <i>Staphylococcus epidermidis</i>                              | -   |
| Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus                    | -/+ | Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus              | -<br>/+ | <i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022                           | -   |
| Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus                      | -/+ | Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus        | -<br>/+ | <i>Streptococcus pyogenes</i>                                  | -   |
| Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus          | -/+ | Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus                | -<br>/+ | <i>Streptococcus salivarius</i>                                | -   |
| Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus                   | -/+ | Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus     | -<br>/+ | 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                              | -<br>/+ | Human Respiratory Syncytial Virus strain Long                  | -/+ |
| Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus             | -/+ | Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus                    | -<br>/+ |                                                                |     |

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.



## POLSKI

### 1. Przeznaczenie

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System to automatyczny test RT-PCR czasu rzeczywistego przeznaczony do jakościowego wykrywania i różnicowania RNA wirusa SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A („grypa typu A”), wirusa grypy typu B („grypa typu B”) i/lub ludzkiego wirusa syncytialnego dróg oddechowych A/B (RSV) w pochodzących z układu oddechowego próbkach pobieranych od osób z podejrzeniem choroby COVID-19 lub innej infekcji układu oddechowego. Ten test jest przeznaczony do wspomagania identyfikacji obecności RNA wirusa SARS-CoV-2, grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ do zautomatyzowanej ekstrakcji RNA, a następnie- RT-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™. RNA jest wyodrębniane z próbek pochodzących z układu oddechowego, amplifikowane w toku reakcji RT-PCR i wykrywane za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla wirusa SARS-CoV-2, grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV.

### 2. Streszczenie i objaśnienia

Koronawirusy to wirusy otoczkowe, zawierające niesegmentowaną nić RNA o dodatniej polaryzacji, należące do rodziny *Coronaviridae*. Znanych jest sześć gatunków koronawirusów powodujących choroby ludzi. Cztery wirusy (229E, OC43, NL63 and HKU1) powodują objawy przeziębienia, a pozostałe dwa (koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, (SARS-CoV) oraz koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego, (MERS-CoV)) są wirusami zoonotycznymi i dają cięższe powikłania. SARS-CoV i MERS-CoV spowodowały w sumie ponad 10 000 zgonów, przy wskaźnikach śmiertelności równych 34% dla MERS-CoV i 10% dla SARS-CoV.

W grudniu 2019 r. niektóre osoby pracujące lub mieszkające wokół targu owoców morza Huanan w mieście Wuhan, prowincji Hubei w Chinach, zgłaszały się z zapaleniem płuc o nieznanym przyczynie. Analiza głębokiego sekwencjonowania próbek pobranych z dróg oddechowych wskazała na obecność nowego koronawirusa, który najpierw otrzymał nazwę nowy koronawirus 2019 (2019-nCoV), a ostatnio — SARS-CoV-2.

Potwierdzono transmisję wirusa SARS-CoV-2 między ludźmi, nawet w okresie inkubacji bez występowania objawów przedmiotowych. Wirus ten powoduje ciężką chorobę układu oddechowego podobną do choroby wywołanej przez SARS-CoV. Chociaż główną chorobą związaną z tym wirusem jest zapalenie płuc, u kilku pacjentów wystąpiło ciężkie zapalenie płuc, obrzęk płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej lub niewydolność wielonarządowa i zgon. Ośrodki Zapobiegania i Zwalczania Chorób (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) stoją na stanowisku, że objawy SARS-CoV-2 mogą występować po 2-14 dniach po ekspozycji. Najczęstszymi objawami są gorączka lub dreszcze, kaszel, zmęczenie, utrata apetytu, bóle mięśni i duszność. Rzadszymi objawami są: ból gardła, nieżyt nosa, ból głowy, biegunka, nudności i wymioty. Zgłaszano również występowanie utraty węchu (anosmia) lub utraty smaku (ageuzja), co poprzedzało objawy ze strony układu oddechowego. Dorosłe osoby w podeszłym wieku oraz osoby obciążone ciężkimi chorobami towarzyszącymi, takimi jak choroby serca, płuc czy cukrzyca wydają się być bardziej zagrożone rozwinięciem poważniejszych powikłań choroby COVID-19.



CDC zaleca pobieranie próbek z górnych dróg oddechowych (wymazy z jamy nosowo-gardłowej (NP, nasopharyngeal) oraz jamy ustnej i gardła (OP, oropharyngeal), wymaz z środkowej części małżowiny nosowej, wymaz z jamy nosowej, popłuczyny/aspirat jamy nosowo-gardłowej lub popłuczyny/aspirat z jamy nosowej pobierane głównie przez lekarza) i/lub dolnych dróg oddechowych (plwocina, aspirat z rurki dotchawiczej lub popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe w przypadku pacjentów z cięższą postacią choroby układu oddechowego) celem identyfikacji wirusa SARS-CoV-2 oraz innych wirusów oddechowych, takich jak grypa i RSV.

Wirusy grypy należą do rodziny Orthomyxoviridae i powodują większość wirusowych zakażeń dolnych dróg oddechowych. Grypa typu A i grypa typu B stanowią znaczącą przyczynę zachorowań i zgonów na całym świecie, uwzględniając fakt, że osoby w podeszłym wieku oraz osłabione są szczególnie narażone na wystąpienie ciężkiej choroby i powikłań, takich jak zapalenie płuc. Osoby zarażone odczuwają niektóre lub wszystkie z wymienionych objawów: gorączka lub poczucie gorączki/dreszcze, kaszel, ból gardła, niedrożność nosa i wydzielina z nosa, bóle mięśniowe, bóle głowy i jadłowstręt. Wirusy grypy mogą rozprzestrzeniać się pomiędzy ludźmi na dwa różne sposoby: przez powietrze (duże krople i aerozole powstające w wyniku kichania i kaszlu) oraz przez bezpośredni i pośredni kontakt.

Wirusy grypy typu A i B są otłuszczonymi wirusami o pojedynczej nici RNA, zawierającymi osiem segmentowanych nici RNA genomu, które zazwyczaj kodują 11 lub 12 białek wirusowych. Płaszcz wirusa, pochodzący z błony plazmatycznej gospodarza, składa się z podwójnej warstwy lipidów zawierających białka przebłonowe, takie jak hemaglutynina (HA) i neuramidaza (NA) oraz białka macierzy M1 i M2. Wirusy grypy typu A dzieli się na podtypy w zależności od antygenowości ich cząsteczek „HA” i „NA”, natomiast wirus grypy typu B dzieli się na dwie linie, odrębne pod względem antygenowym i genetycznym – Victoria i Yamagata.

Ludzkie wirusy syncytialne dróg oddechowych (RSV) A i B należą do rodziny Paramyxoviridae i stanowią najważniejsze wirusowe czynniki wywołujące ostre zakażenia dróg oddechowych. RSV są otłuszczonymi, niesegmentowanymi wirusami o genomie zawierającym pojedynczą nić liniowego RNA. Wirus syncytialny dróg oddechowych stanowi czynnik często przyczyniający się do zakażeń dróg oddechowych, powodujący zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc oraz przewlekłe obturacyjne zakażenia płuc u osób w każdym wieku. Osoby zarażone często odczuwają niektóre lub wszystkie z wymienionych objawów: wyciek z nosa, niska gorączka, kaszel, ból gardła, ból głowy i świszczący oddech. Wirus RSV jest przenoszony przez duże krople wydzieliny z nosa i gardła zarażonej osoby, bliski kontakt lub samozarażenie po dotknięciu skażonych powierzchni.

Rozpoznanie może stanowić problem, ponieważ liczne patogeny mogą powodować ostre zakażenia dróg oddechowych dające podobne objawy. Wykazano, że oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym stanowią czułe i swoiste narzędzia diagnostyczne do wykrywania wirusa SARS-CoV-2, wirusów grypy typu A, grypy typu B oraz RSV.

### 3. Zasada procedury

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System jest przeznaczony do identyfikacji obecności wirusów SARS-CoV-2, grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV w próbkach pobranych z dróg oddechowych. Wykrywanie opiera się na jednoetapowym formacie oznaczania RT-PCR w czasie rzeczywistym, w którym odwrotna transkrypcja, następnie amplifikacja swoistych docelowych sekwencji odbywa się w tej samej próbówce reakcyjnej. Docelowa sekwencja izolowanego RNA podlega transkrypcji za pomocą odwrotnej



transkryptazy, generując komplementarne DNA, a następnie amplifikacji dwóch konserwatywnych regionów genu N (N1 i N2) w przypadku wirusa SARS-CoV-2, konserwatywnego regionu genu M1 (w przypadku grypy typu A i grypy typu B) oraz konserwatywnego regionu genu N w przypadku wirusa RSV przy użyciu swoistych starterów oraz sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnych.

Zasada działania zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™.

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System składa się z dwóch różnych probówek reakcyjnych. Jedna z probówek umożliwia wykrywanie i różnicowanie RNA wirusów grypy typu A, typu B i/lub RSV (folia przezroczysta czerwona lub 1A) a druga swoiste wykrywanie RNA wirusa SARS-CoV-2 (folia przezroczysta zielona lub 1G). Każda probówka zawiera wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTPS, bufor, polimeraza, odwrotna transkryptaza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną (endogenną w probówce reakcyjnej SARS-CoV-2 reaction tube) do monitorowania procesu ekstrakcji i/lub inhibicji aktywności polimerazy. Oznaczenia SARS-CoV-2 wykorzystują ludzki gen porządkowy human jako endogenną kontrolę wewnętrzną (gen ludzkiej RNazy P). Ludzkie geny porządkowe biorą udział w podstawowych komórkowych czynnościach porządkowych i w związku z tym oczekuje się, że będą występować we wszystkich ludzkich komórkach jądrazastych oraz zachowywać względnie stałe poziomy ekspresji. Wszystkie sekwencje docelowe RNA ulegają amplifikacji oraz wykrywaniu w swoistych kanałach (475/520, 585/630 i/lub 630/665), a kontrola wewnętrzna (IC) w kanale 530/565. Przy oznaczeniu wirusa grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV, sekwencja docelowa RNA wirusa grypy typu A są amplifikowane i wykrywane w kanale 475/520, sekwencja docelowa RNA wirusa grypy typu B w kanale 585/630, sekwencja docelowa RNA RSV w kanale 630/665, a kontrola wewnętrzna (IC) tego oznaczenia w kanale 530/565. Przy oznaczeniu wirusa SARS-CoV-2 amplifikacja sekwencji docelowej genu N2 i jej wykrywanie następuje w kanale 475/520, sekwencji docelowej genu N1 w kanale 630/665, a endogennej kontroli wewnętrznej (IC) w kanale 530/565.

## 4. Dostarczane odczynniki

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w tabeli 1:



| Kod               | Odczynnik/materiał                 | Opis                                                                                                                              | Kolor/kod kreskowy                            | Ilość                     |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| <b>VS-ABR212R</b> | Flu A, Flu B & RSV reaction tube   | Mieszanina enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontroli wewnętrznej w formacie stabilizowanym            | Przezroczysta czerwona folia lub folia 1A     | 2 woreczki po 12 probówek |
| <b>VS-NCO312</b>  | SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube | Mieszanina enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz endogennej kontroli wewnętrznej w formacie stabilizowanym | Przezroczysta zielona folia lub folia 1G      | 2 woreczki po 12 probówek |
| <b>VS-RB09</b>    | Rehydration Buffer tube            | Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu                                                                                | Przezroczysta pomarańczowa folia lub folia 11 | 1 woreczek po 24 probówki |

Tabela 1. Odczynniki i materiały zawarte w zestawie VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System o nr kat. VS-FNR124 (444217).

## 5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (nr ref.: 442827 lub 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (nr ref.: 437519)
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Końcówki z filtrem
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe

## 6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbówki reakcyjne, można je użyć w ciągu maksymalnie 28 dni.

## 7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.



- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Przez cały czas należy unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do pipet wyporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki.
- Należy dopilnować użycia jednej próbki w celu określenia, czy występuje RNA wirusa grypy typu A, wirusa grypy typu B i RSV w pozycji 2 (zielona) oraz drugiej próbki w celu określenia, czy występuje RNA wirusa SARS-CoV-2 w pozycji 4 (niebieska). Należy uważać, aby w trakcie całego procesu nie doszło do pomylenia próbek.
- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W miejscu przeprowadzania testu nie należy jeść, pić ani palić tytoniu. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, przetwarzania i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.



## 8. Procedura

### 8.1. POBIERANIE, PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT PRÓBEK

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System został poddany walidacji w odniesieniu do wymazów z jamy nosowo-gardłowej/ jamy ustnej i gardła pobieranych na podłoża do transportu wirusów (VTM, Viral Transport Medium) (Vircell S.L., Hiszpania).

Inne rodzaje próbek z wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła na VTM muszą zostać zwalidowane przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się w warunkach zwalidowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi powinien odbywać się w temperaturze 2–8°C zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 48 godzin) zalecamy przesyłanie w temperaturze  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Zaleca się używanie świeżych próbek do testu. Probki można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 48 godzin lub zamrożone w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  lub idealnie  $-70^{\circ}\text{C}$  w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

### 8.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBK I EKSTRAKCJA RNA

Przygotować próbkę zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkowania zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Pobrać pipetą 400 µl wymazu z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranej na wirusowym podłożu transportowym i przenieść do probówki z buforem BD MAX™ TNA-3 i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejsć do obsługi systemu BD MAX™.

Uwaga: Probówka reakcyjna Flu A, Flu B & RSV reaction tube została poddana walidacji przy użyciu próbek o objętości 200–400 µl, a probówka reakcyjna SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube przy użyciu próbek o objętości 400–750 µl.

### 8.3. PROTOKÓŁ PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™.





### 8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Uwaga: Jeśli już utworzono test zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit, można pominiąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ wybrać zakładkę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) Wpisać nazwę testu (tj. VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2, FluA+B,RSV)) w oknie „Test Name” (Nazwa testu) na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje).
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać opcję „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna stężona, liofilizowana mieszanina wzorcowa MM z buforem rehydratacyjnym (typ 5)).
- 6) W „Sample extraction parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Definiowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do 950 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W przypadku korzystania z oprogramowania w wersji 5.00 lub nowszej oraz używania oznaczonych kodem kreskowym probówek zamkniętych folią, w polu „Custom Barcodes” (Niestandardowe kody kreskowe) należy wybrać następującą konfigurację:
  - a. Snap-In 2 Barcode: 1A (dotyczy probówki reakcyjnej Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
  - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (dotyczy probówki z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube)
  - c. Snap-In 4 Barcode: 1G (dotyczy probówki reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) Dla pozycji probówek Snap-In 2 (zielona) i Snap-In 4 (niebieska) konieczne jest wypełnienie pól „PCR Settings” (Ustawienia reakcji PCR) oraz „Test Steps” (Etapy testu).
- 10) Snap-In 2 (zielona). Na karcie „PCR settings”(Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 2).

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

Tabela 2. Ustawienia PCR

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe



przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

- 11) Snap-In 2 (zielona). Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przestłuch widmowy) (tabela 3.).

|                                       |                 | False Receiving Channel (Fałszywy kanał odbiorczy) |         |         |         |         |
|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                       | Channel (Kanał) | 475/520                                            | 530/565 | 585/630 | 630/665 | 680/715 |
| Excitation Channel (Kanał wzbudzenia) | 475/520         | -                                                  | 0,0     | 0,0     | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 530/565         | 0,0                                                | -       | 2,0     | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 585/630         | 0,0                                                | 0,0     | -       | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 630/665         | 0,0                                                | 0,0     | 4,0     | -       | 0,0     |
|                                       | 680/715         | 0,0                                                | 0,0     | 0,0     | 0,0     | -       |

Tabela 3. Parametry „Spectral cross-talk”

- 12) Snap-In 2 (zielona). W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 4)

| Step Name (Nazwa etapu)                                                                                             | Profile Type (Typ profilu) | Cycles (Cykle) | Time (s) (Czas(y)) | Temperature (Temperatura) | Detect (Wykrywanie) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Reverse transcription (Odwrotna transkrypcja)                                                                       | Wstrzymanie                | 1              | 900                | 45°C                      | -                   |
| Initial denaturation (Wstępna denaturacja)                                                                          | Wstrzymanie                | 1              | 120                | 98°C                      | -                   |
| Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (Gromadzenie danych)) | 2-Temperatura              | 45             | 10                 | 95°C                      | -                   |
|                                                                                                                     |                            |                | 61,1               | 63°C                      | ✓                   |

Tabela 4. Protokół PCR

- 13) Snap-In 4 (niebieska). Na karcie „PCR settings”(Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 5).

| Channel (Kanał) | Alias (Alias)                                | Gain (Wzmocnienie) | Threshold (Wartość progowa) | Ct Min (Ct Min) | Ct Max (Ct Max) |
|-----------------|----------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| 475/520 (FAM)   | Sekwencja docelowa genu N2 wirusa SARS-CoV-2 | 80                 | 150                         | 0               | 40              |
| 530/565 (HEX)   | Endogenna kontrola wewnętrzna (IC)           | 80                 | 150                         | 0               | 35              |
| 585/630 (ROX)   | -                                            | 0                  | 0                           | 0               | 0               |
| 630/665 (Cy5)   | Sekwencja docelowa genu N1 wirusa SARS-CoV-2 | 80                 | 150                         | 0               | 40              |
| 680/715 (Cy5.5) | -                                            | 0                  | 0                           | 0               | 0               |

Tabela 5. Ustawienia PCR



Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

- 14) Snap-In 4 (niebieska). Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przesłuch widmowy) (tabela 6.).

|                                       |         | False Receiving Channel (Fałszywy kanał odbiorczy) |         |         |         |         |         |
|---------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                       |         | Channel (Kanał)                                    | 475/520 | 530/565 | 585/630 | 630/665 | 680/715 |
| Excitation Channel (Kanał wzbudzenia) | 475/520 | -                                                  | 3,0     | 0,0     | 0,0     | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 530/565 | 1,0                                                | -       | 0,0     | 0,0     | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 585/630 | 0,0                                                | 0,0     | -       | 0,0     | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 630/665 | 0,0                                                | 0,0     | 0,0     | -       | 0,0     | 0,0     |
|                                       | 680/715 | 0,0                                                | 0,0     | 0,0     | 0,0     | -       | -       |

Tabela 6. Parametry „Spectral cross-talk”

- 15) Snap-In 4 (niebieska). W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 7)

| Step Name (Nazwa etapu)                                                                                             | Profile Type (Typ profilu) | Cycles (Cykle) | Time (s) (Czas(y)) | Temperature (Temperatura) | Detect (Wykrywanie) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Reverse transcription (Odwrotna transkrypcja)                                                                       | Wstrzymanie                | 1              | 900                | 45°C                      | -                   |
| Initial denaturation (Wstępna denaturacja)                                                                          | Wstrzymanie                | 1              | 120                | 98°C                      | -                   |
| Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (Gromadzenie danych)) | 2-Temperatura              | 45             | 10                 | 95°C                      | -                   |
|                                                                                                                     |                            |                | 61,1               | 63°C                      | ✓                   |

Tabela 7. Protokół PCR

- 16) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).

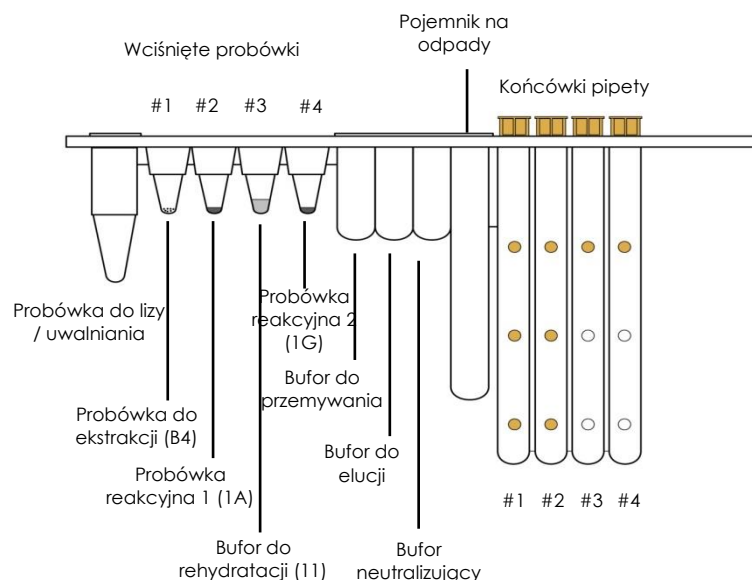
### 8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- 1) Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden indywidualny pasek odczynnikowy z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3. Delikatnie uderzyć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie probówek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™.
- 2) Wyjąć potrzebną liczbę probówek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć probówkę (probówki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja Snap-In 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- 3) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę probówek reakcyjnych Flu A, Flu B & RSV reaction tube (czerwona folia lub folia 1A) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja Snap-In 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)



- a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
- b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbówki.
- 4) Wyjąć potrzebną liczbę probówek Rehydration Buffer tube (pomarańczowa folia lub folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja Snap-In 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
  - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbówki.
- 5) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę probówek reakcyjnych SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (zielona folia lub folia 1G) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja Snap-In 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)
  - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
  - b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbówki i nie przylega do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbówki.

Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3.



### 8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać zakładkę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać opcję VSARSCoV2,FluA+B,RSV (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz punkt 8.3.1).



- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny próbówki z buforem próbki do okna „Sample tube” (Probówka z próbka) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Worklist” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich próbek z buforem próbki. Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz probówki z buforem próbki zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną próbówkę z buforem próbki w statywie (statywach) BD MAX™.
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge do systemu BD MAX™.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

### 8.3.4 Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...)
- 4) Kliknąć przycisk „Print or Export” (Drukuj lub eksportuj) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu).

## 9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 2). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w tabeli 8. i 9.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™.

Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższych tabel:



a. Probówka reakcyjna *Flu A*, *Flu B* & *RSV* reaction tube: Pozycja Snap-In 2

| Grypa typu A (475/520) | Grypa typu B (585/630) | RSV (630/665) | Kontrola wewnętrzna (530/565) | Interpretacja                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|------------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +                      | +                      | +             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu A, wirusa grypy typu B i RSV <sup>1</sup>                                                                                                                                                             |
| +                      | -                      | -             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu A, nie wykryto RNA wirusa grypy typu B i RSV <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| +                      | +                      | -             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B, nie wykryto RNA RSV <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| +                      | -                      | +             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu A i RSV, nie wykryto RNA wirusa grypy typu B <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| -                      | +                      | -             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu B, nie wykryto RNA wirusa grypy typu A i RSV <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| -                      | +                      | +             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA wirusa grypy typu B i RSV, nie wykryto RNA wirusa grypy typu A <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| -                      | -                      | +             | +/- <sup>1</sup>              | Wykryto RNA RSV, nie wykryto RNA wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B <sup>1</sup>                                                                                                                                             |
| -                      | -                      | -             | + <sup>2</sup>                | Nie wykryto RNA wirusa grypy typu A, wirusa grypy typu B i RSV <sup>2</sup>                                                                                                                                                         |
| -                      | -                      | -             | - <sup>2</sup>                | Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji. <sup>2</sup> |
| IND                    | IND                    | IND           | IND                           | Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.                                                   |
| INC                    | INC                    | INC           | INC                           | Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.                                                            |

Tabela 8. Interpretacja próbki Probówka reakcyjna *Flu A*, *Flu B* & *RSV* reaction tube

+: Wystąpiła amplifikacja

-: Nie wystąpiła amplifikacja

**1** Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Kontrola wewnętrzna może wykazywać sygnał amplifikacji lub nie ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej zamiast kontroli wewnętrznej. W tych wypadkach wykrywanie IC nie jest konieczne.

**2** Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia (wartość Ct jest mniejsza niż 40). Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej wyniku nierozstrzygającego (UNR). W przypadku braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce ujemnej zaleca się powtórzyć oznaczenie.



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

| SARS-CoV-2<br>(sekwencja docelowa genu N2) (475/520) | Endogenna kontrola wewnętrzna (530/565) | SARS-CoV-2<br>(sekwencja docelowa genu N1) (630/665) | Interpretacja                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +                                                    | +/- <sup>3</sup>                        | +                                                    | Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 <sup>3</sup>                                                                                                                                                                                   |
| + <sup>4</sup>                                       | +/- <sup>3</sup>                        | -                                                    | Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 <sup>3,4</sup>                                                                                                                                                                                 |
| -                                                    | +/- <sup>3</sup>                        | + <sup>4</sup>                                       | Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 <sup>3,4</sup>                                                                                                                                                                                 |
| -                                                    | + <sup>5</sup>                          | -                                                    | Nie wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 <sup>5</sup>                                                                                                                                                                               |
| -                                                    | - <sup>5</sup>                          | -                                                    | Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji. <sup>5</sup> |
| IND                                                  | IND                                     | IND                                                  | Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.                                                   |
| INC                                                  | INC                                     | INC                                                  | Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.                                                            |

Tabela 9. Interpretacja próbki Probówka reakcyjna SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła

**3** Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Endogenna kontrola wewnętrzna (IC) może wykazywać sygnał amplifikacji lub go nie wykazywać. Czasami wykrywanie kontroli wewnętrznej (IC) nie jest konieczne ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej.

**4** Jeżeli dochodzi do amplifikacji tylko jednej sekwencji docelowej genu N, należy sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji. W razie wątpliwej interpretacji, w zależności od dostępnego materiału, zaleca się:

- ponownie wyizolować oraz przebadac inny alikwot tej samej próbki (w razie możliwości, zwiększając objętość próbki do 750 µl) lub,
- pozyskać nową próbkę i wykonać ponowne oznaczenie.

**5** W przypadku ujemnego wyniku docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2, sygnał amplifikacji kontroli wewnętrznej (IC) musi mieć wartość Ct mniejszą niż 35. Wartość Ct może być bardzo zmienna ponieważ endogenna kontrola wewnętrzna to ludzki gen porządkowy, który powinien występować we wszystkich ludzkich komórkach jądrowych oryginalnej próbki. W przypadku braku sygnału lub wartości Ct endogennej kontroli wewnętrznej  $\geq 35$ , wynik należy uznać za Nierozstrzygający i konieczne jest ponowne wykonanie testu.





W przypadku ponownego uzyskania dwuznacznego wyniku zaleca się ponownie zapoznać się z instrukcją użycia i przeanalizować proces izolacji stosowany przez użytkownika w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania każdego etapu reakcji RT-qPCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.

## 10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Chociaż ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranych na VTm.
- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbówki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbówki.
- Na ogół występujący na spodzie próbówki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formacie stabilnym (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białawego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego kwasu nukleinowego z próbek z dróg oddechowych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez wirus SARS-CoV-2, wirus grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV którejkolwiek próbki zawierającej wysokie stężenia docelowej sekwencji RNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Specyficzne kombinacje starterów i sond do wykrywania konserwatywnych regionów genu *N* (SARS-CoV-2) wykorzystane w zestawie VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zostały opracowane na podstawie oznaczenia amerykańskiej organizacji CDC do specyficznego wykrywania wirusa SARS-CoV-2 poprzez zamplikowanie dwóch unikatowych regionów genu *N*. Nie wykazuje znaczących kombinowanych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą, wirusem SARS-CoV ani innymi koronawirusami, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z kilku czynników oraz ich kombinacji, w tym z powodu:
  - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod przechowywania próbek.
  - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym izolacji RNA).
  - degradacji wirusowego RNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
  - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania startera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych wariantów wirusa SARS-CoV-2, grypy i/lub RSV.
  - wiremii w próbce poniżej granicy wykrywania testu.



- o obecności inhibitorów reakcji RT-qPCR albo innych typów substancji interferujących.
  - o nieprzestrzegania instrukcji użycia i procedury przeprowadzania testu.
- W próbówce reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube amplifikacja jednej sekwencji docelowej lub nawet losowy wynik dodatni sugeruje znacząco inny uzysk amplifikacji sekwencji docelowej genu N. W przypadku próbek o niskiej wirerii może dochodzić do amplifikacji jednej sekwencji docelowej genu N. W razie wątpliwości zaleca się przekazać materiał laboratorium referencyjnemu w celu wykonania dalszych badań.
- W przypadku niektórych próbek może nie dojść do uzyskania krzywej amplifikacji RNazy P (w próbówce reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube) z powodu niskiej liczby komórek ludzkich w oryginalnej próbce klinicznej. Ujemny sygnał kontroli wewnętrznej (IC) nie wyklucza obecności RNA wirusa SARS-CoV-2 i/lub RSV w próbce klinicznej.
- Wynik dodatni testu nie musi konieczne oznaczać obecności żywych wirusów i nie sugeruje, że te wirusy są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność docelowych sekwencji wirusowych.
- Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2, wirusem grypy i/lub RSV i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia lub innego postępowania z pacjentem. Nie określono optymalnych rodzajów próbek ani czasu występowania maksymalnych stężeń wirusa w trakcie zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nowym szczepem wirusa grypy typu A. Do wykrycia wirusa może być konieczne pobranie wielu próbek (różne rodzaje i punkty czasowe) od tego samego pacjenta.
- Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób układu oddechowego są ujemne, a objawy kliniczne pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia wirusem SARS-CoV-2, grypy i/lub RSV wówczas należy wziąć pod uwagę wynik fałszywie ujemny i rozważyć ponowne wykonanie testu.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbówce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

## 11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera kontrolę wewnętrzną w każdej próbówce reakcyjnej Flu A, Flu B & RSV reaction tube oraz endogenną kontrolę wewnętrzną w każdej próbówce reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube, która potwierdza prawidłowe zastosowanie techniki.

## 12. Charakterystyka wydajnościowa

### 12.1. Czulość i swoistość kliniczna

Wydajność kliniczną zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System testowano indywidualnie dla każdej próbki reakcyjnej.



Wydajność kliniczną probówki reakcyjnej *Flu A, Flu B & RSV reaction tube* badano za pomocą 344 próbek z dróg oddechowych (wymazów z jamy ustnej i gardła) pobranych od pacjentów z objawami. Wyniki te porównano z wynikami uzyskanymi za pomocą metody detekcji molekularnej (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Uzyskano następujące wyniki:

| Probówka reakcyjna <i>Flu A, B &amp; RSV reaction tube</i> | cobas® Influenza A/B & RSV (Roche) |     |     |        |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|-----|--------|
|                                                            |                                    | +   | -   | Ogółem |
|                                                            | +                                  | 157 | 2*  | 159    |
|                                                            | -                                  | 7*  | 178 | 185    |
|                                                            | Ogółem                             | 164 | 180 | 344    |

Tabela 10. Wyniki porównawcze dla wirusa grypy typu A.

**Zgodność wyników dodatnich >96% i zgodność wyników ujemnych >99%.**

\*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody.

| Probówka reakcyjna <i>Flu A, Flu B &amp; RSV reaction tube:</i> | cobas® Influenza A/B & RSV (Roche) |     |     |        |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|-----|--------|
|                                                                 |                                    | +   | -   | Ogółem |
|                                                                 | +                                  | 99  | 4*  | 103    |
|                                                                 | -                                  | 1*  | 240 | 241    |
|                                                                 | Ogółem                             | 100 | 244 | 344    |

Tabela 11. Wyniki porównawcze dla wirusa grypy typu B.

**Zgodność wyników dodatnich >99% i zgodność wyników ujemnych >98%.**

\*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody.

| Probówka reakcyjna <i>Flu A, Flu B &amp; RSV reaction tube</i> | cobas® Influenza A/B & RSV (Roche) |    |     |        |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|----|-----|--------|
|                                                                |                                    | +  | -   | Ogółem |
|                                                                | +                                  | 22 | 4*  | 26     |
|                                                                | -                                  | 3* | 315 | 318    |
|                                                                | Ogółem                             | 25 | 319 | 344    |

Tabela 12. Wyniki porównawcze dla wirusa RSV

**Zgodność wyników dodatnich >88% i zgodność wyników ujemnych >99%.**

\*Niska ilość RNA matrycy w tej próbce z dróg oddechowych jest poniżej granicy wykrywania zastosowanej metody.



Wydajność kliniczną probówki reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube badano przy użyciu 254 próbek z dróg oddechowych (wymazów z jamy nosowo gardłowej pobranych na podłoże transportowe Vircell) od pacjentów z podejrzeniem klinicznym choroby COVID-19 lub innych podobnych chorób układu oddechowego. Wyniki te porównano z wynikami uzyskanymi w drodze rozpoznania klinicznego za pomocą oznaczenia Simplexa™ COVID-19 Direct, a w przypadku rozbieżności przeprowadzono analizę zgodnie z protokołem Charité.

| Probówka reakcyjna SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube | Alternatywne oznaczenia RT-PCR |    |     |        |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------|----|-----|--------|
|                                                       |                                | +  | -   | Ogółem |
|                                                       | +                              | 63 | 2*  | 65     |
|                                                       | -                              | 0  | 189 | 189    |
|                                                       | Ogółem                         | 63 | 191 | 254    |

Tabela 13. Wyniki porównawcze dla wirusa SARS-CoV-2.

\*Wstępne rozpoznanie dla jednej z dwóch próbek było nieważne i zostało zgłoszone pacjentowi jako wynik dodatni w celach zapobiegawczych i dla okresu kwarantanny.

Za pomocą probówki reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube wykryto dwie próbki dodatnie, które nie zostały wykryte przy użyciu oznaczenia Simplexa™ COVID-19 Direct i protokołu Charité.

Zgodność wyników dodatnich (PPA, Positive Percent Agreement) i zgodność wyników ujemnych (NPA, Negative Percent Agreement) dla probówki reakcyjnej SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube wyniosła odpowiednio >99% i 98%.

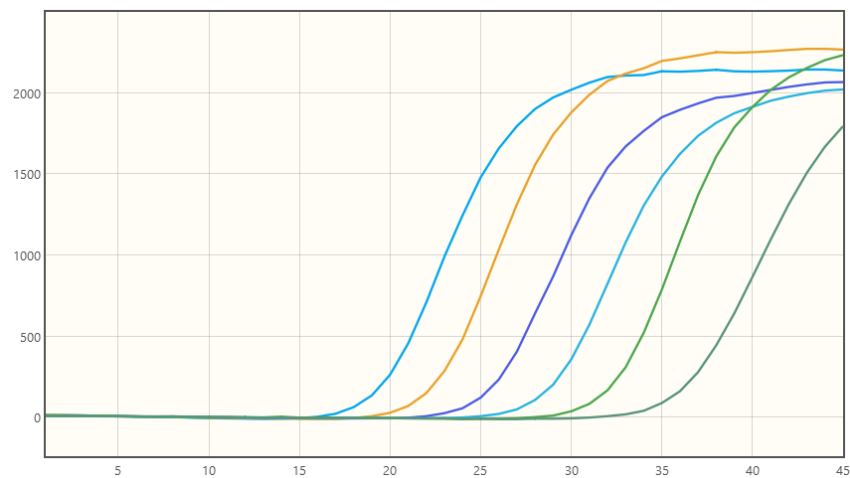
Wyniki wykazują wysoką zgodność w zakresie wykrywania wirusów SARS-CoV-2, grypy typu A, grypy typu B i/lub RSV przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Czulość analityczna

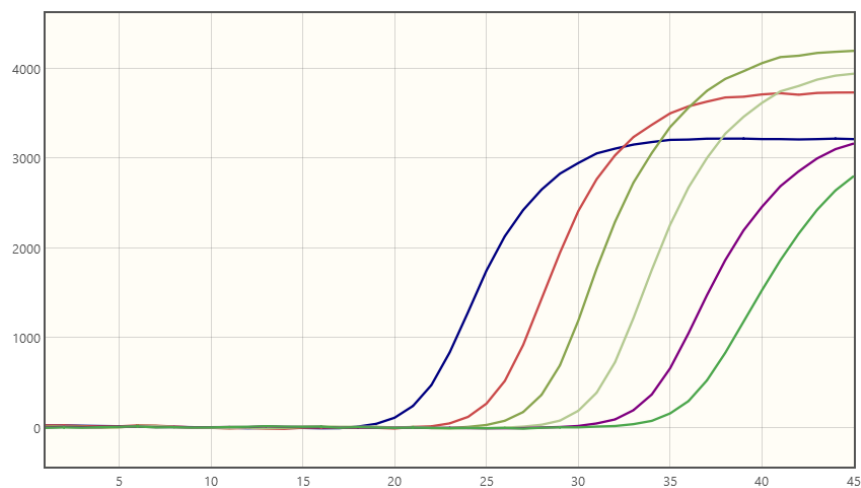
Zestaw VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ma granicę wykrywalności  $\geq 10$  kopii genomu na reakcję dla wirusa grypy typu A,  $\geq 20$  kopii genomu na reakcję dla wirusa grypy typu B,  $\geq 2$  kopie genomu na reakcję dla RSV i  $\geq 5$  kopii genomu na reakcję dla wirusa SARS-CoV-2 ze wskaźnikiem wyników dodatnich wynoszącym  $\geq 95\%$  (rys. 2, 3, 4, 5 i 6).



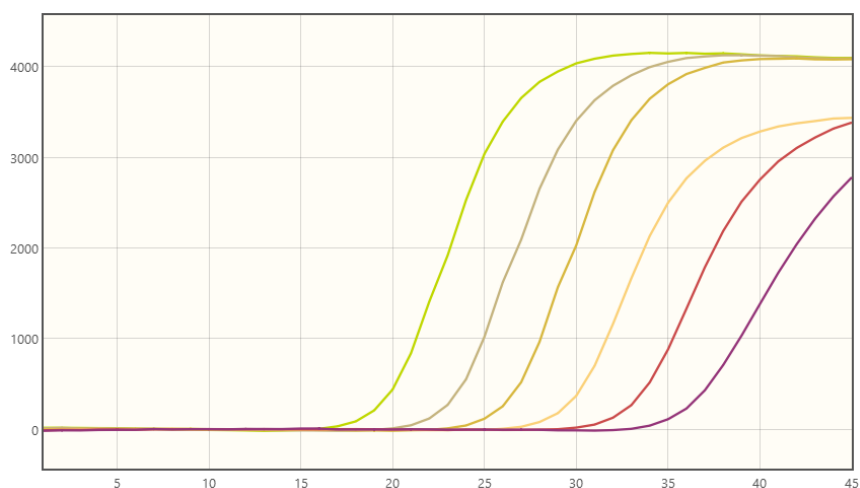
Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy grypy typu A ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^1$  kopii na reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 475/520 (FAM)).



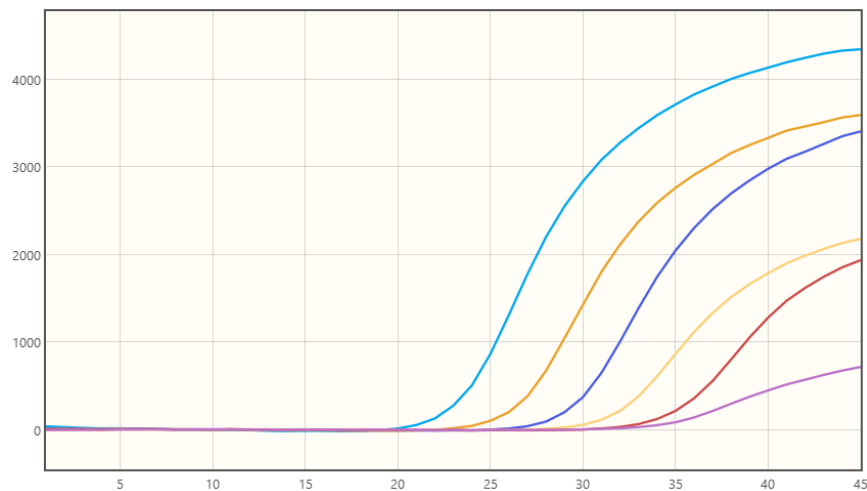
Rysunek 3. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy grypy typu B ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^1$  kopii na reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 585/630 (ROX)).



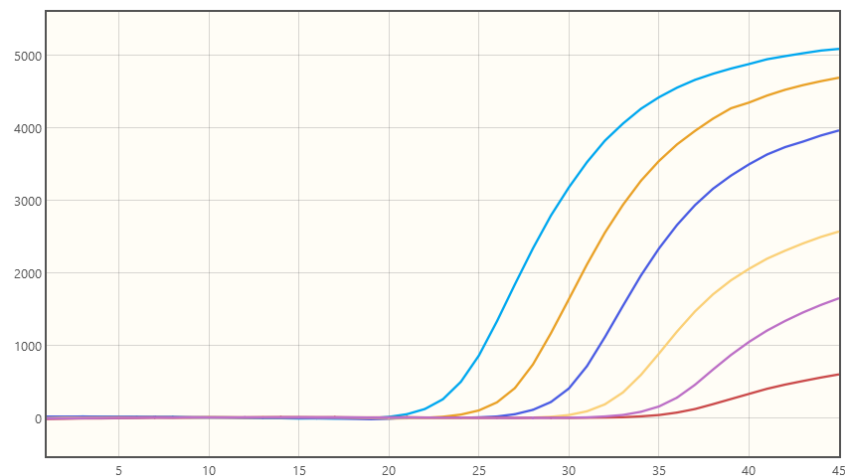
Rysunek 4. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy RSV ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^1$  kopii na reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 630/665 (Cy5)).



Rysunek 5. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy wirusa SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \times 10^4$ - $9,9 \times 10^0$  i  $5,0 \times 10^0$  kopii genomu na reakcję) w systemie BD MAX™ (kanał 475/520 (FAM)).



Rysunek 6. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy wirusa SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \times 10^4$ - $9,9 \times 10^0$  i  $5,0 \times 10^0$  kopii genomu na reakcję) w systemie BD MAX™ (kanał 630/665 (Cy5)).



### 12.3. Swoistość analityczna

Swoistość wykrywania oznaczenia SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów reprezentujących najczęściej występujące patogeny zakażeń dróg oddechowych. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów, z wyjątkiem docelowych patogenów każdego oznaczenia:



| Badania reaktywności krzyżowej                            |     |                                                              |     |                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| Ludzki adenowirus typu 1-5, 8, 15, 31, 40 i 41            | -   | Wirus grypy typu A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (klad 3C.3a)  | -/+ | Wirus grypy typu A/chicken/Hong kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) | -/+ |
| Bokawirus                                                 | -   | Wirus grypy typu A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (klad 3C.2a) | -/+ | Wirus grypy typu A/chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)                | -/+ |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i>                          | -   | Wirus grypy typu A/Newcastle/607/2019 (H3N2)                 | -/+ | Wirus grypy typu A/Hong kong/1073/99 (H9N2)                       | -/+ |
| <i>Bordetella holmesii</i>                                | -   | Wirus grypy typu A/New York/39/2012 (H3N2)                   | -/+ | Wirus grypy typu A/Hong kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26   | -/+ |
| <i>Bordetella parapertussis</i>                           | -   | Wirus grypy typu A/Ohio/2/2012 (H3N2)                        | -/+ | Wirus Influenza B/Brisbane/60/2008                                | -/+ |
| <i>Bordetella pertussis</i>                               | -   | Wirus grypy typu A/Perth/1001/2018 (H3N2)                    | -/+ | Wirus grypy typu B/Colorado/6/2017                                | -/+ |
| <i>Chlamydia caviae</i>                                   | -   | Wirus grypy typu A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)      | -/+ | Wirus grypy typu B/Malaysia/2506/2004                             | -/+ |
| <i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A i C                   | -   | Wirus grypy typu A/South Australia/55/2014 (H3N2)            | -/+ | Wirus grypy typu B/Maryland/15/2016                               | -/+ |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1                      | -   | Wirus grypy typu A/Souh Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)    | -/+ | Wirus grypy typu B/Netherlands/207/06                             | -/+ |
| Ludzki koronawirus 229E, OC43, NL63 i HKU1                | -   | Wirus grypy typu A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)           | -/+ | Wirus grypy typu B/Netherlands/2518/2016 (klad 1A)                | -/+ |
| Koronawirus MERS                                          | -   | Wirus grypy typu A/Texas/50/2012 (H3N2)                      | -/+ | Wirus grypy typu B/Nevada/3/2011                                  | -/+ |
| SARS Koronawirus szczep Frankfurt 1                       | -   | Wirus grypy typu A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (klad 3C2a.1)     | -/+ | Wirus grypy typu B/New Jersey/1/2012                              | -/+ |
| Wirus SARS-CoV-2, szczep BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 | -/+ | Wirus grypy typu A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C)     | -/+ | Wirus grypy typu B/Texas/02/2013                                  | -/+ |
| Wirus SARS-CoV-2, szczep 2019-nCoV/Italy-INMI1            | -/+ | Wirus grypy typu A/Victoria/210/2009 (H3N2)                  | -/+ | Wirus grypy typu B/Townsville/8/2016                              | -/+ |
| Wirus SARS-CoV-2 izolat Australia/VIC01/2020              | -/+ | Wirus grypy typu A/Victoria/361/2011 (H3N2)                  | -/+ | Wirus grypy typu B/Canberra/11/2016                               | -/+ |
| Wirus SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1                        | -/+ | Wirus grypy typu A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)          | -/+ | Wirus Influenza B/Florida/4/2006                                  | -/+ |
| Wirus SARS-CoV-2 szczep 2019nCoV/USAWA1/2020              | -/+ | Wirus A/Anhui/01/2005 (H5N1)                                 | -/+ | Wirus Influenza B/Florida/07/2004                                 | -/+ |
| Enterowirus 68 i 71                                       | -   | Wirus grypy typu A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)      | -/+ | Wirus grypy typu B/Guangdong/120/2000                             | -/+ |
| Enterowirus Echowirus 11 i 30                             | -   | Wirus grypy typu A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)      | -/+ | Wirus grypy typu B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)          | -/+ |





| Badania reaktywności krzyżowej                                   |     |                                                                            |     |                                                                       |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| Enterowirus wirus Coxsackie A24, A9 i B3                         | -   | Wirus grypy typu A/ chicken/Vietnam /NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) | -/+ | Wirus grypy typu B/ Jiangsu/10/2003                                   | -/+ |
| <i>Haemophilus influenzae</i> MinnA                              | -   | Wirus grypy typu A/ chicken/Vietnam /NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a   | -/+ | Wirus grypy typu B/Massachusetts/2/2012                               | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09         | -/+ | Wirus grypy typu A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)                         | -/+ | Wirus grypy typu B/Netherlands/365/2016 (klad 3)                      | -/+ |
| Wirus grypy typu A/California/7/2009(H1N1)pdm09                  | -/+ | Wirus grypy typu A/common magpie/Hong kong/645/2006 (H5N1)                 | -/+ | Wirus grypy typu B/Phuket/3073/2013                                   | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09      | -/+ | Wirus grypy typu A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)                              | -/+ | Wirus grypy typu B/Texas/06/2011                                      | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09             | -/+ | Wirus grypy typu A/Egypt/321/2007 (H5N1)                                   | -/+ | Wirus grypy typu B/Wisconsin/1/2010                                   | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09                  | -/+ | Wirus grypy typu A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)                  | -/+ | Wirus grypy typu B/Wisconsin/1/2010 BX-41A                            | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (klad 6B.1) | -/+ | Wirus grypy typu A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)          | -/+ | <i>Legionella bozemanii</i>                                           | -   |
| Wirus grypy typu A/New Caledonia/20/99(H1N1)                     | -/+ | Wirus grypy typu A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29               | -/+ | <i>Legionella dumoffii</i>                                            | -   |
| Wirus grypy typu A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09                  | -/+ | Wirus grypy typu A/Hong kong/213/2003 (H5N1)                               | -/+ | <i>Legionella longbeachae</i>                                         | -   |
| Wirus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09     | -/+ | Wirus grypy typu A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30                     | -/+ | <i>Legionella micdadei</i>                                            | -   |
| Wirus grypy typu A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09                   | -/+ | Wirus grypy typu A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1)                    | -/+ | <i>Legionella pneumophila</i>                                         | -   |
| Wirus grypy typu A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09                | -/+ | Wirus grypy typu A/Japanese white eye/Hong kong/1038/2006 (H5N1)           | -/+ | Ludzki metapneumowirus A i B                                          | -   |
| Wirus grypy typu A/PR/8/34 (H1N1)                                | -/+ | Wirus grypy typu A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)                                | -/+ | <i>Moraxella catarrhalis</i>                                          | -   |
| Wirus grypy typu A/Brisbane/117/2018 (H3N2)                      | -/+ | Wirus grypy typu A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)                     | -/+ | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                                          | -   |
| Wirus grypy typu A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)                     | -/+ | Wirus grypy typu A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)                 | -/+ | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> szczep bez oporności na ryfampicynę | -   |
| Wirus grypy typu A/Fujian/411/2002 (H3N2)                        | -/+ | Wirus grypy typu A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)                            | -/+ | Ludzkie wirusy paragrypy 1, 2, 3 i 4                                  | -   |



| Badania reaktywności krzyżowej                             |     |                                                                     |     |                                                                             |     |
|------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| Wirus grypy typu A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)     | -/+ | Wirus grypy typu A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 | -/+ | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Typ A1 i g885652                              | -   |
| Wirus grypy typu A/Hong kong/4801/2014 (H3N2)              | -/+ | Wirus grypy typu A/duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)                | -/+ | Ludzki rhinovirus typ C                                                     | -   |
| Wirus grypy typu A/Hong kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) | -/+ | Wirus grypy typu A/duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (klad 2.3.4.4)       | -/+ | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>                           | -   |
| Wirus grypy typu A/Indiana/8/2011 (H3N2)v                  | -/+ | Wirus grypy typu A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)             | -/+ | <i>Staphylococcus epidermidis</i>                                           | -   |
| Wirus grypy typu A/Indiana/10/2011 (H3N2)v                 | -/+ | Wirus grypy typu A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)              | -/+ | <i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022                                        | -   |
| Wirus grypy typu A/Kansas/14/2017 (H3N2)                   | -/+ | Wirus grypy typu A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)        | -/+ | <i>Streptococcus pyogenes</i>                                               | -   |
| Wirus grypy typu A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)       | -/+ | Wirus grypy typu A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)                | -/+ | <i>Streptococcus salivarius</i>                                             | -   |
| Wirus grypy typu A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)                | -/+ | Wirus grypy typu A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1     | -/+ | Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych (RSV) A i B (szczep CH93(18) -18) | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v               | -/+ | Wirus grypy typu A/Anhui/1/2013 (H7N9)                              | -/+ | Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych szczep Long                       | -/+ |
| Wirus grypy typu A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v          | -/+ | Wirus grypy typu A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)                    | -/+ |                                                                             |     |

Tabela 14. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.

## 12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System względem wirusa **SARS-CoV-2** oceniano w odniesieniu do RNA z ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep 2019-nCoV/Italy-INMI1, wirusa SARS-CoV-2 szczep 2019nCoV/USA-WA1/2020, syntetycznych kontroli RNA dla dwóch wariantów wirusa SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 izolowany w Australia/VIC01/2020) oraz MN908947.3 (SARS-CoV-2 izolowany w Wuhan-Hu-1), uzyskując wyniki dodatnie.

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System względem **wirusa grypy typu A** oceniano w odniesieniu do RNA wyizolowanego z następujących szczepów: wirus grypy typu A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/California/7/2009(H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (klad 6B.1), wirus grypy typu A/New Caledonia/20/99(H1N1), wirus grypy typu A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09, wirus grypy typu A/PR/8/34



(H1N1), wirus grypy typu A/Brisbane/117/2018 (H3N2), wirus grypy typu A/Brisbane/1028/2017 (H3N2), wirus grypy typu A/Fujian/411/2002 (H3N2), wirus grypy typu A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2), wirus grypy typu A/Hong kong/4801/2014 (H3N2), wirus grypy typu A/Hong kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), wirus grypy typu A/Indiana/8/2011 (H3N2)v, wirus grypy typu A/Indiana/10/2011 (H3N2)v, wirus grypy typu A/Kansas/14/2017 (H3N2), wirus grypy typu A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2), wirus grypy typu A/Kumamoto/102/2002 (H3N2), wirus grypy typu A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v, wirus grypy typu A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v, wirus grypy typu A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (klad 3C.3a), wirus grypy typu A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (klad 3C.2a), wirus grypy typu A/Newcastle/607/2019 (H3N2), wirus grypy typu A/New York/39/2012 (H3N2), wirus grypy typu A/Ohio/2/2012 (H3N2), wirus grypy typu A/Perth/1001/2018 (H3N2), wirus grypy typu A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), wirus grypy typu A/South Australia/55/2014 (H3N2), wirus grypy typu A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2), wirus grypy typu A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), wirus grypy typu A/Texas/50/2012 (H3N2), wirus grypy typu A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (klad 3C2a.1), wirus grypy typu A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C), wirus grypy typu A/Victoria/210/2009(H3N2), wirus grypy typu A/Victoria/361/2011 (H3N2), wirus grypy typu A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2), wirus grypy typu A/Anhui/01/2005 (H5N1), wirus grypy typu A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1), wirus grypy typu A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1), wirus grypy typu A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1), wirus grypy typu A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a, wirus grypy typu A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1), wirus grypy typu A/common magpie/Hong kong/645/2006 (H5N1), wirus grypy typu A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1), wirus grypy typu A/Egypt/321/2007 (H5N1), wirus grypy typu A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1), wirus grypy typu A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1), wirus grypy typu A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29, wirus grypy typu A/Hong kong/213/2003 (H5N1), wirus grypy typu A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30, wirus grypy typu A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1), wirus grypy typu A/Japanese white eye/Hong kong/1038/2006 (H5N1), wirus grypy typu A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), wirus grypy typu A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1), wirus grypy typu A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1), wirus grypy typu A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1), wirus grypy typu A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, wirus grypy typu A/duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3), wirus grypy typu A/duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4), wirus grypy typu A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8), wirus grypy typu A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8), wirus grypy typu A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), wirus grypy typu A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), wirus grypy typu A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, wirus grypy typu A/Anhui/1/2013 (H7N9), wirus grypy typu A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9), wirus grypy typu A/chicken/Hong kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), wirus grypy typu A/chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2), wirus grypy typu A/Hong kong/1073/99 (H9N2), wirus grypy typu A/Hong kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26, uzyskując wynik dodatni.

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System względem **wirusa grypy typu B** oceniano w odniesieniu do RNA wyizolowanego z następujących szczepów: wirus grypy typu B/Brisbane/60/2008, wirus grypy typu B/Colorado/6/2017, wirus grypy typu B/Malaysia/2506/2004, wirus grypy typu B/Maryland/15/2016, wirus grypy typu B/Netherlands/207/06, wirus grypy typu B/Netherlands/2518/2016 (klad 1A), wirus grypy typu B/Nevada/3/2011, wirus grypy typu B/New Jersey/1/2012, wirus grypy typu B/Texas/02/2013, wirus grypy typu B/Townsville/8/2016 (**B/linia Victoria**); wirus grypy typu B/Canberra/11/2016, wirus grypy typu B/Florida/4/2006, wirus grypy typu B/Florida/07/2004, wirus grypy typu B/Guangdong/120/2000, wirus grypy typu B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39), wirus grypy typu B/Jiangsu/10/2003, wirus grypy typu



B/Massachusetts/2/2012, wirus grypy typu B/Netherlands/365/2016 (klad 3), wirus grypy typu B/Phuket/3073/2013, wirus grypy typu B/Texas/06/2011, wirus grypy typu B/Wisconsin/1/2010, wirus grypy typu B/Wisconsin/1/2010 BX-41A (**B/linia Yamagata**), uzyskując wynik dodatni.

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System względem **RSV** potwierdzono w odniesieniu do RNA wyizolowanego z wirusa RSV typu A i B (szczep CH93 (18)-18) oraz szczepu Long ludzkiego syncytialnego wirusa oddechowego, uzyskując wynik dodatni.

### 13. Bibliography/Bibliografia

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/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/i/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/](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/) . Accessed September 2020.
25. S. Subhash Bawage et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
26. French, et al. Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
27. X. Yu et al. Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
28. N. Mazur et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
29. F. de-Paris et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
30. A. Hu et al. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
31. M. Hindiyeh et al. Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51 (7): 2421-2424.



## 14. Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników IVD

|                                                                                   |                                                                                     |                                                                                   |                                                    |                                                                                   |                                                                               |                                                                                   |                                         |                                                                                     |                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|  | <i>In vitro</i> diagnostic device<br>Urządzenie do diagnostyki w warunkach in vitro |  | Keep dry<br>Przechowywać w suchym miejscu          |  | Use by<br>Użyć przed                                                          |  | Manufacturer<br>Producent               |  | Batch code (Lot)<br>Kod partii (seria) |
|  | Consult Instructions for Use<br>Sprawdzić w Instrukcji Użycia                       |  | Temperature limitation<br>Ograniczenie temperatury |  | Contains sufficient for <n> test<br>Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów |  | Sample diluent<br>Rozcieńczalnik próbek |  | Catalog number<br>Numer katalogowy     |

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](http://www.certest.es)



VIASURE online

F-362 rev01

**VIASURE**



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC