

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

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

Handbook for the following references/

Manual pentru următoarele referințe:

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the identification of SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and /or RSV in respiratory samples. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of two conserved regions of N gene (N1 and N2) for SARS-CoV-2, a conserved region of the M1 gene for Flu A and Flu B, and a conserved region of the N gene for RSV using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the



fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

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



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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents at all times. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- Make sure to use a tube to determine RNA from Influenza A, Influenza B and RSV in Snap-In 2 (green position) and another tube to determine RNA from SARS-CoV-2 in Snap-In 4 (blue position). Be careful not to mix them throughout the entire process.
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.



- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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

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

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 48 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 48 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 48 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.



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

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2,FluA+B,RSV).
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1A (concerning Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G (concerning SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) "PCR Settings" and "Test Steps" must be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.
- 10) Snap-In 2 (green). In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).

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

Table 2. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

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



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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 4. PCR protocol.

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

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

Table 5. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

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



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

Table 6. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 7. PCR protocol.

16) Click the "Save Test" button.

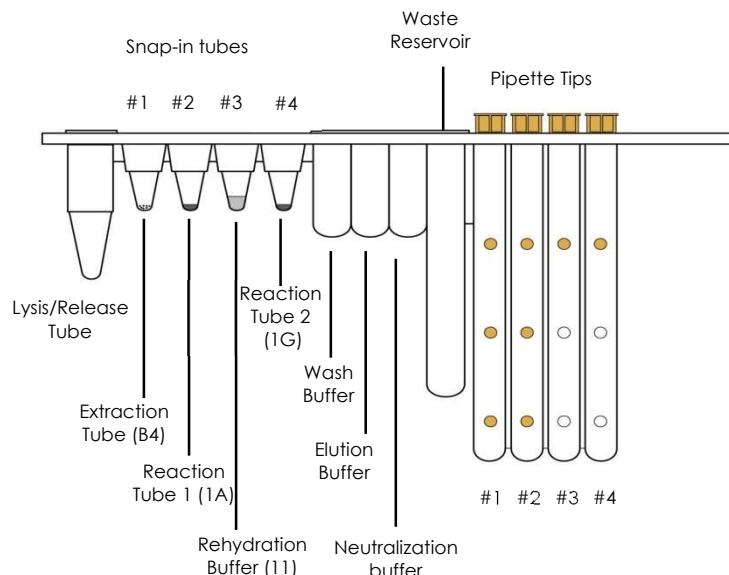
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (red or 1A foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange or 11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
 - In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.



- 5) Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 ($N_1 + N_2$) reaction tubes (green or 1G foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack). See Figure 1).
- Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- In the "Test" drop down menu, select VSARSCoV2, FluA+B, RSV (if not already created see Section 8.3.1).
- Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- Close the BD MAX™ System door.
- Click "Start Run" to begin the procedure.



8.3.4 BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Tables 8 and 9.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Results should be read and analyzed using the following tables:

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

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

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

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred



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

2 A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive (Ct less than 40). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay.

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

SARS-CoV-2 (N2 target) (475/520)	Endogenous Internal Control (530/565)	SARS-CoV-2 (N1 target) (630/665)	Interpretation
+	+/- ³	+	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected³
+ ⁴	+/- ³	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected^{3,4}
-	+ ⁵	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected⁵
-	- ⁵	-	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ⁵
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

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

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

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

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



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

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of conserved regions of N gene (SARS-CoV-2) used in VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System have been designed based on the US CDC assay for specific detection of SARS-CoV-2 by amplifying two unique regions of the N gene. They do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, SARS-CoV or other coronaviruses, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2, Flu and/or RSV variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.



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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

The results were as follows:



	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
+	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.*

	cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)		
		+	-
+	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.*

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

Table 12. Comparative results for RSV.

Positive percent agreement is >88% and negative percent agreement is >99%.**The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.*

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



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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

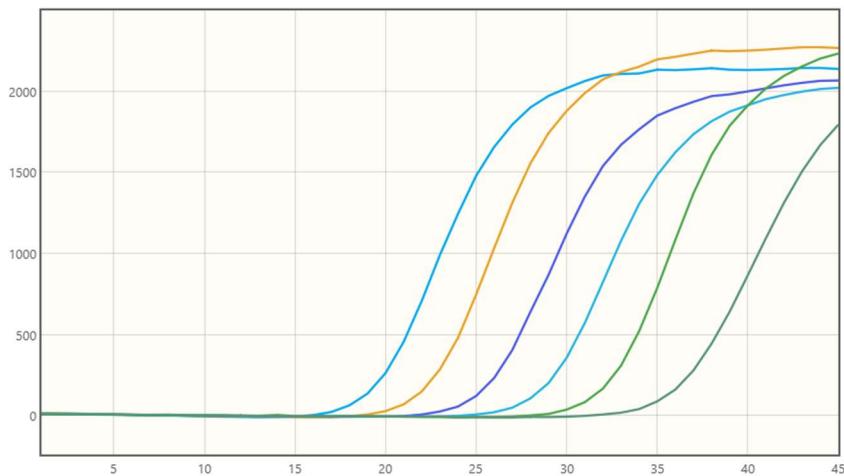
Figure 2. Dilution series of Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

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

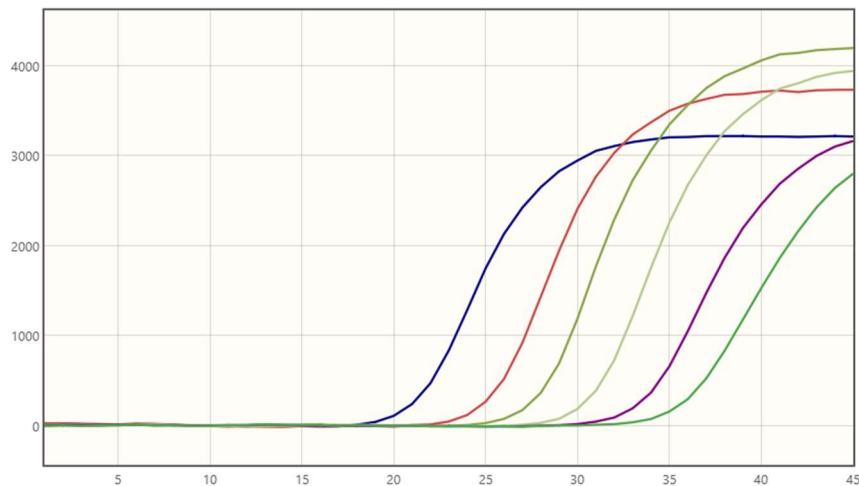


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

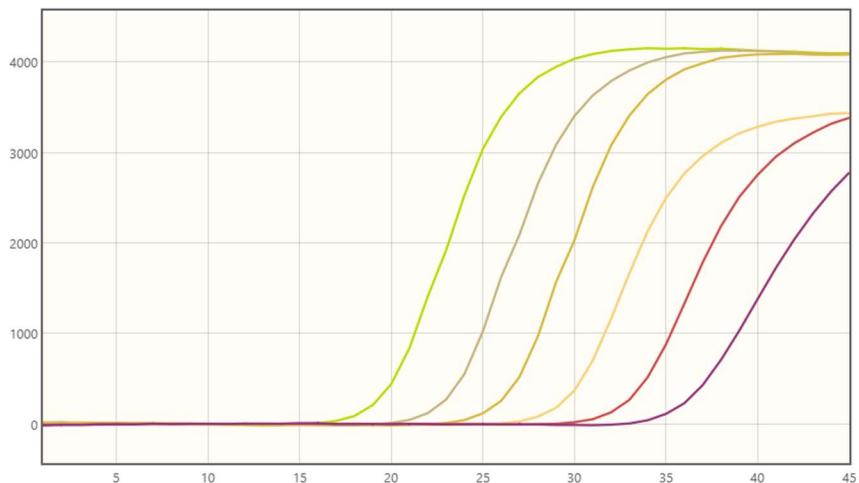


Figure 5. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

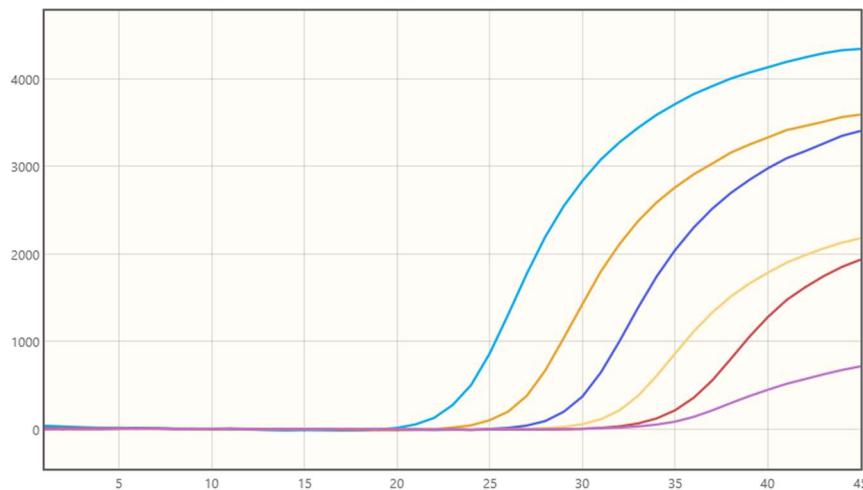
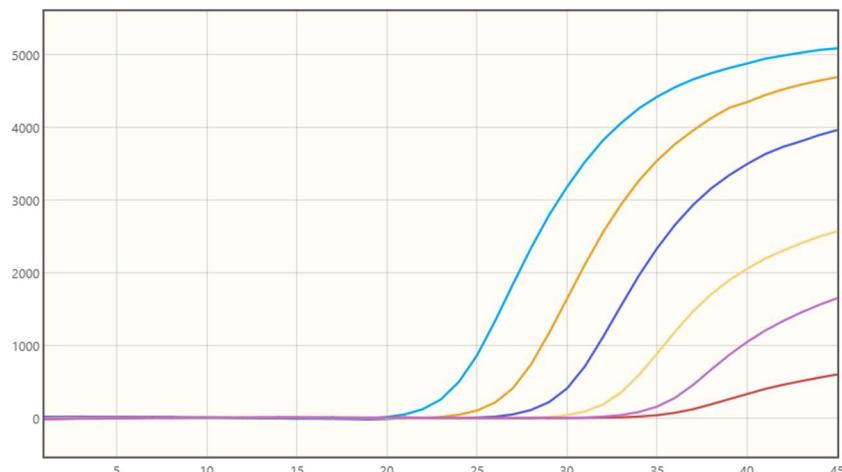


Figure 6. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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



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



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

Table 14. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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



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

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



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

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

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



ROMÂNĂ

1. Utilizarea prevăzută

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System este un test RT-PCR automat, în timp real, destinat pentru detectarea calitativă și diferențierea ARN de la virusul SARS-CoV-2, virusul gripal A (Flu A), virusul gripal B (Flu B) și/sau virusul respirator sincitial uman A/B (RSV) în probele respiratorii de la persoane suspectate de COVID-19 sau altă infecție respiratorie de către furnizorul de asistență medicală respectiv. Acest test este destinat pentru utilizare ca adjuvant la identificarea prezenței ARN-ului viral de SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și/sau RSV. Testul utilizează sistemul BD MAX™ pentru extragerea automată a ARN și efectuarea ulterioră în timp real a RT-PCR, folosind reactivii furnizați în combinație cu reactivi universali și cu consumabile pentru sistemul BD MAX™. ARN este extras din probele respiratorii, amplificat folosind RT-PCR și detectat cu ajutorul sondelor reporter cu pigment fluorescent, specifice pentru SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și/sau RSV.

2. Rezumat și explicare

Coronavirusul este un virus încapsulat, nesegmentat, cu ARN de sens pozitiv, aparținând familiei Coronaviridae. Sunt cunoscute șase specii de coronavirus care cauzează boli la om. Patru viruși (229E, OC43, NL63 și HKU1) cauzează simptome comune de răceală iar ceilalți doi (coronavirusul sindromului respirator acut sever (SARS-CoV) și coronavirusul sindromului respirator din orientul Mijlociu (MERS-CoV) sunt zoonotici și produc complicații mai severe. SARS-CoV și MERS-CoV au cauzat, în mod cumulat, peste 10.000 de cazuri în ultimele două decenii, cu rate ale mortalității de 34% pentru MERS-CoV și 10% pentru SARS-CoV.

În decembrie 2019, un număr de oameni care lucrau sau locuiau în zona pieței de fructe de mare Huanan din Wuhan, provincia Hubei, China, au prezentat pneumonie de cauză necunoscută. Analiza de secvențiere profundă a probelor respiratorii a indicat un nou coronavirus, care inițial a fost numit noul coronavirus 2019 (2019-nCoV), iar mai apoi SARS-CoV-2.

Transmiterea de la om la om a SARS-CoV-2 a fost confirmată, chiar și în perioada de incubare fără simptome, iar virusul cauzează boala respiratorie severă la fel ca cea produsă de SARS-CoV. Deși pneumonia este principala boală asociată, un număr mic de pacienți au dezvoltat pneumonie severă, edem pulmonar, sindrom de detresă respiratorie acută, insuficiență organică multiplă și deces. Centrele de prevenire și control al bolilor (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideră că simptomele de SARS-CoV-2 pot apărea între 2 și 14 zile de la expunere, cele mai frecvente dintre acestea fiind febră, frisoane, tuse, oboseală, anorexie, mialgie și dispnee. Simptome mai puțin frecvente sunt durerea în gât, congestia nazală, cefaleea, diareea, gheață și vârsăturile. De asemenea, au fost raportate pierderea simțului miroslui (anosmie) sau pierderea simțului gustului (ageuzie) care preced instalarea simptomelor respiratorii. Adulții mai în vîrstă și persoanele care au probleme medicale preexistente severe, precum boli cardiace sau pulmonare ori diabet, par să prezinte un risc crescut de a dezvolta complicații mai severe ale bolii cauzate de COVID-19.

CDC recomandă probe din tractul respirator superior (tampoane nasofaringiene (NP) și orofaringiene (OP), tampon nazal din regiunea cornetului mijlociu, tampon nazal, probe din spălătură/aspirat nasofaringian sau



spălătură/aspirat nazal (NW) recoltate în principal de un cadru medical) și/sau probe din tractul respirator inferior (spută, aspirat endotraheal sau lavaj bronhoalveolar la pacienți cu boala respiratorie mai severă) pentru identificarea SARS-CoV-2 și a altor virusi respiratori, cum sunt virusul gripal și RSV.

Virusii gripali aparțin familiei *Orthomyxoviridae* și cauzează majoritatea infecțiilor de tract respirator inferior. Gripa de tip A și B sunt o cauză semnificativă a morbidității și mortalității pe plan mondial, având în vedere că vârstnicii și persoanele compromise prezintă un risc deosebit de dezvoltare a bolii severe și complicațiilor precum pneumonia. Oamenii dezvoltă unele din aceste simptome sau pe toate: febră sau stare febrilă/frisoane, tuse, dureri în gât, blocaj nazal și scurgeri nazale, mialgie, cefalee și anorexie. Virusul gripal se poate transmite de la o persoană la alta în două moduri diferite: prin aer (picături mari și aerosoli eliberați în timpul strănutului și tusei) și prin contact direct sau indirect.

Virusii gripali A și B sunt virusi încapsulați, cu ARN monocatenar care conține opt lanțuri segmentate de genom ARN, care codifică de obicei 11 sau 12 proteine virale. Capsula virală, derivată din membrana plasmatică a gazdei, constă dintr-un bistrat lipidic conținând proteine transmembranare, precum hemaglutinina (HA) și neuramidaza (NA), și proteine matriciale M1 și M2. Virusii gripali A sunt clasificați, suplimentar, în subtipuri pe baza antigenicității moleculelor lor „HA” și „NA”, în timp ce virusii gripali B se împart în 2 linii distincte din punct de vedere antigenic și genetic, Victoria și Yamagata.

Virusii sincițiali respiratorii umani A și B (RSV) aparțin familiei *Paramyxoviridae* și sunt cei mai importanți agenți viralii ai infecțiilor respiratorii acute. RSV este un virus încapsulat, nesegmentat, antisens, cu genom de ARN monocatenar liniar. Virusul sincițial respirator este un contributor frecvent la dezvoltarea infecțiilor respiratorii care cauzează bronșită, pneumonie și infecții pulmonare cronice obstructive la persoane de toate vîrstele. Oamenii dezvoltă adeseori unele din aceste simptome sau pe toate: rinoree, febră de nivel scăzut, tuse, dureri în gât, cefalee și wheezing. RSV se transmite prin picături mari de secreție nasofaringiană de la persoanele infectate, contactul strâns sau auto-inocularea prin atingerea suprafețelor contaminate.

Diagnosticul poate fi problematic pentru că o gamă largă de patogeni poate cauza infecții respiratorii acute ce prezintă sindroame clinice similare. Testele PCR în timp real s-au dovedit a fi un instrument de diagnostic sensibil și specific pentru detectarea virusilor SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și RSV.

3. Principiile procedurii

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System este destinat pentru identificarea SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și/sau RSV în probele respiratorii. Detectarea se face prin RT-PCR în timp real, în formatul într-o singură etapă, prin care transcriptia inversă și amplificarea ulterioară a secvenței țintă specifice au loc în același tub de reacție. Ținta ARN izolată este transcrisă cu generarea de ADN complementar cu ajutorul revers transcriptazei, urmată de amplificarea a două regiuni conservate a genei N (N1 și N2) pentru SARS-CoV-2, a unei regiuni conservate a genei M1 pentru Flu A și Flu B și a unei regiuni conservate a genei N pentru RSV, folosind primari specifici și sonde cu marcaj fluorescent.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System se bazează pe activitatea de tip 5' exonuclease a ADN polimerazei. În cursul amplificării ADN, această enzimă clivează sonda legată la



secvență de ADN complementar, separând molecula blocantă de substanță fluoroforă. Această reacție generează o creștere a semnalului fluorescent care este proporțională cu cantitatea de model țintă. Această fluorescentă este măsurată de sistemul BD MAX™.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System este compus din două tuburi de reacție diferite. Unul din aceste tuburi detectează și diferențiază ARN de la Flu A, Flu B și/sau RSV (folie transparentă roșie sau 1A) iar celălalt tub detectează în mod specific ARN de la SARS-CoV-2 (folie transparentă verde sau 1G). Fiecare tub conține toate componentele necesare pentru testul PCR în timp real (primeri/sonde specifice, dNTPs, tampon, polimerază, revers-transcriptază) într-un format stabilizat, precum și ca control intern (endogen în tubul de reacție SARS-CoV-2) pentru monitorizarea procesului de extractie și/sau inhibarea activității polimerazei. Testul SARS-CoV-2 utilizează o genă menajeră umană în calitate de control intern endogen (genă RNase P umană). Genele menajere umane sunt implicate în întreținerea de bază a celulei și, prin urmare, este de așteptat să fie prezente în toate celulele nucleate umane și să mențină un nivel de expresie relativ constant. Fiecare ARN țintă este amplificat și detectat în canale specifice (475/520, 585/630 și/sau 630/665) iar controlul intern (IC) în canalul 530/565. În testele pentru Flu A, Flu B și/sau RSV, ARN-ul țintă al Flu A este amplificat și detectat în canalul 475/520, ARN-ul țintă al virusului gripal de tip B în canalul 585/630, ARN-ul țintă al RSV în canalul 630/665 iar controlul intern (IC) al acestui test în canalul 530/565. În testul pentru SARS-CoV-2, ținta N2 este amplificată și detectată în canalul 475/520, ținta N1 în canalul 630/665 iar controlul endogen intern (IC) în canalul 530/565.

4. Reactivi furnizați

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include următoarele materiale și următorii reactivi, detaliați/detaliate în Tabelul 1:

Referință	Reactiv/Material	Descriere	Culoare/Cod de bare	Cantitate
VS-ABR212R	Flu A, Flu B & RSV reaction tube	Un amestec de enzime, sonde, primeri, tampon, dNTPs, stabilizatori și control intern în format stabilizat.	Transparent Folie roșie sau 1A	2 pungi cu câte 12 tuburi
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Un amestec de enzime, sonde, primeri, tampon, dNTPs, stabilizatori și control intern endogen în format stabilizat	Transparent Folie verde sau 1G	2 pungi cu câte 12 tuburi
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Soluție pentru reconstituirea produsului stabilizat	Transparent Folie portocalie sau 11	1 pungă cu 24 tuburi

Tabelul 1 Reactivi și materiale furnizate în VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System cu Cat. nr. VS-FNR124 (444217).

5. Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator

Lista de mai jos include materiale și echipamente care sunt necesare pentru utilizare, însă nu sunt incluse în VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR în timp real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 sau 442828)



- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vortex.
- Micropipete (cu funcționare precisă între 2 și 1000 µl).
- Vârfuri filtrante.
- Mănuși consumabile, fără pulbere

6. Condiții de transport și depozitare

- Kiturile pot fi transportate și depozitate la 2-40°C până la data de expirare, care este înscrisă pe etichetă.
- După deschiderea pungilor de aluminiu care conțin tuburile de reacție, acestea pot fi utilizate timp de până la 28 de zile.

7. Precauții pentru utilizatori

- Acest produs este destinat pentru utilizare numai de către utilizatori profesioniști, cum sunt profesioniști de laborator sau din domeniul sănătății și tehnicieni, instruiți în ceea ce privește tehniciile de biologie moleculară.
- Pentru utilizare în diagnostic *in vitro*.
- Nu utilizați reactivi și/sau materiale expirate.
- Nu utilizați kitul dacă eticheta care sigilează cutia exterioară este ruptă.
- Nu utilizați reactivii dacă cutia de protecție este deschisă sau ruptă la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă pungile de protecție sunt deschise sau rupte la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă desicantul nu este prezent sau este rupt în interiorul pungilor cu reactivi.
- Nu îndepărtați desicantul din pungile cu reactivi.
- Închideți prompt pungile de protecție care conțin reactivi, cu fermoarul, după fiecare utilizare. Îndepărtați din pungi aerul în exces înainte de sigilare.
- Nu utilizați reactivii dacă folia a fost ruptă sau deteriorată.
- Nu amestecați reactivii din pungi și/sau kituri și/sau loturi diferite.
- Protejați reactivii împotriva umidității. Expunerea prelungită la umiditate poate afecta performanța produsului.
- Feriți componentele de lumină.
- În cazul în care sunt efectuate alte teste PCR în aceeași arie generală a laboratorului, trebuie să aveți grijă ca VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, orice reactivi suplimentari necesari pentru testare și sistemul BD MAX™ să nu fie contaminate. Evitați în permanență contaminarea microbiană și cu ribonuclează (RNază)/dezoxiribonuclează (DNază). Se recomandă utilizarea vârfurilor de pipetare consumabile, lipsite de RNază/DNază, rezistente la aerosoli sau cu dislocuire pozitivă. Utilizați câte un vârf nou pentru fiecare probă. Trebuie să schimbați mănușile înainte de manipularea reactivilor și cartușelor.
- Asigurați-vă că utilizați un tub pentru determinarea ARN de la virusul gripal A, virusul gripal B și RSV în poziția de fixare 2 (poziția verde) și un alt tub pentru determinarea ARN de la SARS-CoV-2 în poziția de fixare 4 (poziția albastră). Aveți grijă să nu le amestecați pe durata desfășurării procesului.
- Pentru a evita contaminarea mediului cu ampliconi, nu rupeți BD MAX™ PCR Cartridge după utilizare. Elementele de sigilare ale BD MAX™ PCR Cartridge sunt concepute să prevină contaminarea.



- Puneți la punct un flux de lucru unidirectional. Acesta trebuie să înceapă în zona de extracție și să continue în zona de amplificare și zona de detectare. Nu duceți probele, echipamentele și reactivii înapoi în zona în care a fost efectuată etapa precedentă.
- Respectați bunele practici de laborator. Purtați echipament de protecție, utilizați mănuși de unică folosință, ochelari de protecție și mască. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în zona de lucru. Spălați-vă pe mâini după ce terminați testul.
- Probele trebuie tratate ca potențial infecțioase, ca fel ca toți reactivii și toate materialele care au fost expuse la probe și trebuie să fie manipulate conform reglementărilor naționale privind siguranța. Luați măsurile de precauție necesare în cursul recoltării, depozitării, tratarii și eliminării probelor.
- Se recomandă decontaminarea cu regularitate a echipamentului utilizat, în special micropipetele și suprafețele de lucru.
- Consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™ pentru avertizări, precauții și proceduri suplimentare.

8. Procedură

8.1. RECOLTAREA, DEPOZITAREA ȘI TRANSPORTUL PROBELOR

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a fost validat pe tampon nasofaringian/orofaringian colectat pe mediu de transport viral (VTM) Vircell S.L., Spania).

Alte tipuri de probe din tampoane nasofaringiene/orofaringiene în VTM trebuie validate de către utilizator.

Recoltarea, depozitarea și transportul probelor trebuie să se încadreze în condițiile validate de către utilizator. În general, probele respiratorii trebuie să fie recoltate și etichetate corespunzător în recipiente curate, cu sau fără mediu de transport (în funcție de tipul probei) și procesate cât mai curând posibil, pentru a se putea garanta calitatea testului. Probele trebuie transportate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 48 de ore, cu respectarea reglementărilor naționale și locale pentru transportul materialelor patogene. În cazul transportului cu durată mare (mai mult de 48 de ore), recomandăm transportul la $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Se recomandă să se utilizeze probe proaspete pentru fiecare test. Probele pot fi depozitate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 48 de ore sau pot fi congelate la -20°C sau, ideal, la -70°C , pentru conservare. Trebuie evitate ciclurile repetitive de congelare-decongelare, pentru a se preveni degradarea probei și a acizilor nucleici.

8.2. PREGĂTIREA PROBEI ȘI EXTRAGEREA ARN

Efectuați pregătirea probei conform recomandărilor date în instrucțiunile de utilizare ale kitului de extracție folosit, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Rețineți faptul că o parte din celelalte probe ar putea necesita pre-procesare. Procedurile de pregătire a extracției, specifice aplicației, trebuie să fie dezvoltate și validate de către utilizator.

1. Pipetați 400 μl din tamponul nasofaringian/orofaringian recoltat pe mediul de transport viral (VTM) într-un tub pentru BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu operarea sistemului BD MAX™.



Notă: Flu A, Flu B & RSV reaction tube a fost validat cu un volum de probă de 200-400 µl iar SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube cu un volum de probă de 400-750 µl.

8.3. PROTOCOLUL PCR

Notă: Pentru instrucțiuni detaliate, vă rugăm să consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™.

8.3.1. Crearea programului de testare PCR pentru VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Notă: Dacă ați creat deja VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection test, puteți sări punctul 8.3.1 și să mergeți direct la 8.3.2.

- 1) Deschideți ecranul „Run” (Rulare) al sistemului BD MAX™, selectați fila „Test Editor” (Editor test).
- 2) Dați click pe butonul „Create” (Creare).
- 3) În fila cu informații de bază, în fereastra „Test Name” (Nume test), denumiți testul: adică, VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2,FluA+B,RSV).
- 4) În meniul defilant „Extraction Type” (Tip extracție), selectați „ExK TNA-3”.
- 5) În meniul defilant „Master Mix Format” (Format general amestecare), alegeti „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat de amestecare generală dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)).
- 6) În „Sample extraction parameters” (Parametri de extracție probă) selectați „User defined” (Definit de utilizator) și ajustați volumul probei până la 950 µl.
- 7) În „Ct Calculation” (Calcul Ct), selectați „Call Ct at Threshold Crossing” (Apelare Ct la depășirea pragului).
- 8) Dacă rulați versiunea de software 5.00 sau mai recentă și aveți tuburi cu fixare cu folie cu cod de bare, în „Custom Barcodes” (Coduri de bare personalizate) selectați următoarea configurație:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1A (referitor la tub de reacție cu Flu A, Flu B & RSV reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (referitor la tub cu Rehydration Buffer tube (tampon de rehidratare))
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G (referitor la SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube)
- 9) „PCR Settings” (Setări PCR) și „Test Steps” (Etape de testare) trebuie completate pentru Snap-In 2 (verde) și Snap-In 4 (albastră).
- 10) Snap-In 2 (verde). În fila „PCR settings” (Setări PCR), introduceți următorii parametri: „Channel Settings” (Setări canal), „Gains” (Câștiguri) și „Threshold” (Prag) (Tabelul 2).



Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Câștig)	Threshold (Prag)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (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

Tabelul 2 Setări PCR

Notă: Se recomandă să setați valorile de prag minime listate mai sus pentru fiecare canal la un moment inițial, dar setările finale trebuie determinate de către utilizatorul final în cursul interpretării rezultatelor, pentru a exista siguranță că pragurile se situează în interiorul fazei exponențiale a curbei de fluorescentă și deasupra oricărui semnal de fundal. Valoarea prag pentru diferite instrumente poate varia datorită intensităților diferențiate ale semnalului.

- 11) Snap-In 2 (verde). În fila „PCR settings” (Setări PCR) introduceți și următorii parametri „Spectral Cross Talk” (Diafonie spectrală) (Tabelul 3).

		False Receiving Channel (Canal fals receptor)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal excitare)	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	-	

Tabelul 3 Parametri de diafonie spectrală

- 12) Snap-In 2 (verde). În fila „Test Steps” (Etape test), introduceți protocolul PCR (Tabelul 4).

Step Name (Nume etapă)	Profile Type (Tip profil)	Cycles (Cicluri)	Time (s) (Timp (s))	Temperature (Temperatură)	Detect (Detectare)
Reverse transcription (Transcripție inversă)	Menținere	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturare inițială)	Menținere	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturare și annealing/extensie (Colectare date))	2 temperaturi	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabelul 4 Protocol PCR.

- 13) Snap-In 4 (albastră). În fila „PCR settings” (Setări PCR), introduceți următorii parametri: „Channel Settings” (Setări canal), „Gains” (Câștiguri) și „Threshold” (Prag) (Tabelul 5).



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

Tabelul 5 Setări PCR

Notă: Se recomandă să setați valorile de prag minime listate mai sus pentru fiecare canal la un moment inițial, dar setările finale trebuie determinate de către utilizatorul final în cursul interpretării rezultatelor, pentru a exista siguranță că pragurile se situează în interiorul fazei exponențiale a curbei de fluorescență și deasupra oricărui semnal de fundal. Valoarea prag pentru diferite instrumente poate varia datorită intensităților diferite ale semnalului.

- 14) Snap-In 4 (albastră). În fila „PCR settings” (Setări PCR) introduceți și următorii parametri „Spectral Cross Talk” (Diafonie spectrală) (Tabelul 6).

		False Receiving Channel (Canal fals receptor)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal excitare)	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	-	

Tabelul 6 Parametri de diafonie spectrală

- 15) Snap-In 4 (albastră). În fila „Test Steps” (Etape test), introduceți protocolul PCR (Tabelul 7).

Step Name (Nume etapă)	Profile Type (Tip profil)	Cycles (Cicluri)	Time (s) (Timp (s))	Temperature (Temperatură)	Detect (Detectare)
Reverse transcription (Transcripție inversă)	Menținere	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturare inițială)	Menținere	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturare și annealing/extensie (Colectare date))	2 temperaturi	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabelul 7 Protocol PCR.

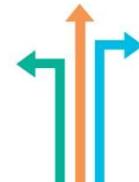
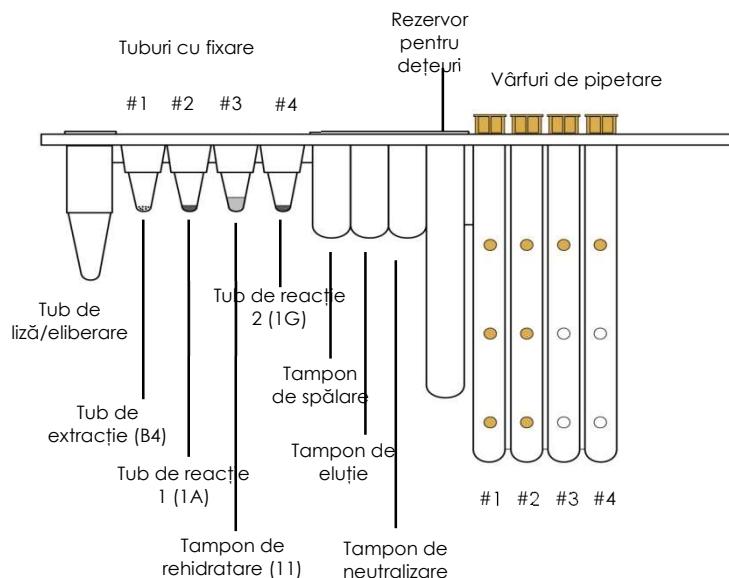
- 16) Dați click pe butonul „Save Test” (Salvare test).

8.3.2. Configurarea stativului BD MAX™



- 1) Pentru fiecare probă de testat, scoateți o bandeletă de reactiv unitarizată din kitul BD MAX™ ExK TNA-3. Loviți cu blândețe fiecare bandeletă de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate lichidele se află la fundul tuburilor și încărcați pe stativele pentru probe ale sistemului BD MAX™.
- 2) Scoateți numărul necesar de BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (folie albă) din punga de protecție respectivă. Fixați tuburile de extractie (folie albă) în pozițiile corespunzătoare de pe bandeleta TNA (poziția de fixare 1, cod de culoare alb pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
- 3) Determinați și separați numărul adecvat de Flu A, Flu B & RSV reaction tubes (folie roșie sau 1A) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 2, cod de culoare verde pe stativ. Consultați Figura 1).
 - a. Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
 - b. Pentru a face o rehidratare corectă, vă rugăm să vă asigurați că produsul liofilizat se află la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
- 4) Scoateți numărul necesar de tuburi Rehydration Buffer tubes (folie portocalie sau 11) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 3, fără cod de culoare pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
 - a. Pentru a asigura un transfer corect, vă rugăm să vă asigurați că lichidul este la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
- 5) Determinați și separați numărul adecvat de SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (folie verde sau 1G) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 4, cod de culoare albastru pe stativ. Consultați Figura 1).
 - a. Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
 - b. Pentru a face o rehidratare corectă, vă rugăm să vă asigurați că produsul liofilizat se află la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.

Figura 1. Bandeletă de reactiv BD MAX™ TNA (TNA) de la BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. Configurarea instrumentului BD MAX™

- 1) Selectați fila „Work List” (Listă de lucru) din ecranul „Run” al software-ului sistemului BD MAX™, versiunea v4.50A sau mai recentă.
- 2) În meniul defilant „Test”, selectați VSARSCoV2,FluA+B,RSV (dacă nu este deja creat, consultați Secțiunea 8.3.1).
- 3) Selectați numărul de lot adecvat al kitului (înscris pe cutia externă a kitului de extracție utilizat) din meniul defilant (optional).
- 4) Introduceți numărul de identificare al tubului pentru probă cu tampon în câmpul Tub probă de pe lista de lucru, fie prin scanarea codului de bare, fie prin introducere manuală.
- 5) Completați câmpul ID probă/pacient și/sau câmpul Număr de ordine în lista de lucru și faceți click pe butonul „Save” (Salvează). Continuați până când toate tuburile pentru probă cu tampon sunt introduse. Asigurați-vă că există o potrivire precisă între ID probă/pacient și tuburile pentru probă cu tampon.
- 6) Puneți tubul pentru probă cu tampon pregătit în stativul/stativele BD MAX™.
- 7) Încărcați stativul/stativele în sistemul BD MAX™ (stativul A este poziționat pe partea stângă a sistemului BD MAX™ iar stativul B pe partea dreaptă).
- 8) Puneți numărul necesar de BD MAX™ PCR Cartridge(s) în sistemul BD MAX™.
- 9) Înhideți ușa sistemului BD MAX™.
- 10) Dați click pe „Start Run” (Pornește rulare) pentru a începe procedura.

8.3.4 Raportul BD MAX™

- 1) În meniul principal, dați click pe „Results” (Rezultate).
- 2) Fie dați dublu click pe rularea dorită în listă, fie apăsați „view button” (butonul de vizualizare).
- 3) Dați click pe „Print” (Imprimare) și selectați: „Run Details, Test Details and Plot...” (Detalii rulare, detalii test și compilare...)
- 4) Dați click pe „Print or Export button” (Butonul Imprimare sau Export) din ecranul „Run Reports” (Rapoarte rulare).

9. Interpretarea rezultatelor

Pentru o descriere detaliată a modului de analiză a datelor, consultați manualul de utilizare a sistemului BD MAX™.

Analiza datelor este efectuată de către software-ul BD MAX™, conform instrucțiunilor producătorului. Software-ul BD MAX™ raportează valorile Ct și curbele de amplificare pentru fiecare canal detector al fiecărei probe testate, în felul următor:

- valoarea Ct de 0 indică faptul că nu a existat o valoare Ct calculată de către software cu pragul specificat (consultați Tabelul 2). Curba de amplificare a probei care arată o valoare Ct „0” trebuie să fie verificată manual.
- valoarea Ct de -1 indică faptul că nu a avut loc niciun proces de amplificare.
- orice altă valoare Ct trebuie interpretată în corelație cu curba de amplificare și conform îndrumărilor de interpretare a probei, expuse în Tabelele 8 și 9.



Verificați semnalul de control intern pentru a verifica corecta funcționare a amestecului de amplificare. În plus, verificați dacă există o raportare de defectiune a sistemului BD MAX™.

Rezultatele trebuie să fie citite și analizate folosind următoarele tabele:

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

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Control intern (530/565)	Interpretare
+	+	+	+/- ¹	ARN Flu A, Flu B și RSV detectat¹
+	-	-	+/- ¹	ARN Flu A detectat, ARN Flu B și RSV nedetectat¹
+	+	-	+/- ¹	ARN Flu A și Flu B detectat și ARN RSV nedetectat¹
+	-	+	+/- ¹	ARN Flu A și RSV detectat și ARN Flu B nedetectat¹
-	+	-	+/- ¹	ARN Flu B detectat, ARN Flu A și RSV nedetectat¹
-	+	+	+/- ¹	ARN Flu B și RSV detectat, ARN Flu A nedetectat¹
-	-	+	+/- ¹	ARN RSV detectat, ARN Flu A și Flu B nedetectat¹
-	-	-	+ ²	ARN Flu A, Flu B și RSV nedetectat²
-	-	-	- ²	Rezultat Nerezolvat (UNR) obținut în prezența inhibitorilor din reacția PCR sau când intervine o problemă generală (neraportată printr-un cod de eroare) în legătură cu etapele de procesare a probei și/sau amplificare.²
IND	IND	IND	IND	Rezultat test Nedeterminat (IND). Datorat defectării sistemului BD MAX™, Rezultat al testului afișat în caz de defectare a instrumentului, asociată unui cod de eroare.
INC	INC	INC	INC	Rezultat test Incomplet (INC). Datorat defectării sistemului BD MAX™ Rezultat al testului afișat în caz de eșec la finalizarea rulării.

Tabelul 8 Interpretarea probelor în Flu A, Flu B & RSV reaction tube

+: A avut loc amplificarea
-: Nu a avut loc amplificarea

1 O probă este considerată pozitivă dacă valoarea Ct obținută este mai mică de 40. Controlul intern poate sau nu să arate un semnal de amplificare deoarece un număr înalt de copiere a țintei poate cauza amplificarea preferențială a acizilor nucleici specifici țintei în locul controlului intern. În aceste cazuri, detectarea IC nu este necesară.

2 O probă este considerată negativă dacă proba nu prezintă niciun semnal de amplificare în sistemul de detecție, dar controlul intern este pozitiv (Ct mai mic de 40). O inhibare a reacției PCR poate fi exclusă prin amplificarea controlului intern. În cazul rezultatelor nerezolvate (UNR), în absența semnalului controlului intern în probă negativă se recomandă repetarea testului.

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



SARS-CoV-2 (țintă N2) (475/520)	Control intern endogen (530/565)	SARS-CoV-2 (țintă N1) (630/665)	Interpretare
+	+/- ³	+	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat ³
+ ⁴	+/- ³	-	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat ^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat ^{3,4}
-	+ ⁵	-	ARN al genei N SARS-CoV-2 nedetectat ⁵
-	- ⁵	-	Rezultat Nerezolvat (UNR) obținut în prezența inhibitorilor din reacția PCR sau când intervine o problemă generală (neraportată printr-un cod de eroare) în legătură cu etapele de procesare a probei și/sau amplificare. ⁵
IND	IND	IND	Rezultat test Nedeterminat (IND). Datorat defectării sistemului BD MAX™. Rezultat al testului afișat în caz de defectare a instrumentului, asociată unui cod de eroare.
INC	INC	INC	Rezultat test Incomplet (INC). Datorat defectării sistemului BD MAX™. Rezultat al testului afișat în caz de eșec la finalizarea rulării.

Tabelul 9 Interpretarea probei în SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+: A avut loc amplificarea

-: Nu a avut loc amplificarea

3 O probă este considerată pozitivă dacă valoarea Ct obținută este mai mică de 40. Controlul intern endogen (IC) poate sau nu să arate un semnal de amplificare. Uneori, detectarea IC nu este necesară deoarece un număr înalt de copiere a țintei poate cauza amplificarea preferențială a acizilor nucleici specifici țintei.

4 Dacă numai un situs țintă al genei N amplifică, verificați forma sigmoidă a curbei și intensitatea fluorescentei. În cazul unui dubiu de interpretare, în funcție de materialul disponibil, se recomandă, de asemenea:

- a) să extrageți și să re-testați un alt alicot din același specimen (dacă este posibil, creșteți volumul probei la 750 µl) sau,
- b) obțineți un nou specimen și re-testați.

5 În caz de situri țintă SARS-CoV-2 negative, IC trebuie să prezinte un semnal de amplificare cu Ct mai mic de 35. Valoarea Ct ar putea fi foarte variabilă datorită faptului că Controlul intern endogen este o genă menajeră umană care ar trebui să fie prezentă în toate celulele nucleate umane din probă originală. Dacă se constată o absență a semnalului sau valoarea Ct ≥ 35 din Controlul intern endogen, rezultatul este considerat ca „Nerezolvat” și este necesară repetarea testării.

În cazul unui rezultat ambiguu obținut în mod continuu, se recomandă să se revadă instrucțiunile de utilizare, procesul de extracție folosit de către utilizator; să se verifice corecta performanță a fiecarei etape RT-qPCR și să se revizuiască parametrii; și să se verifice forma sigmoidă a curbei și intensitatea fluorescentei.

Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.



10. Limitările testului

- Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.
- Deși testul poate fi utilizat cu alte tipuri de probe, acesta a fost validat cu tamponi nasofaringiene/orofaringiene recoltate în VTM.
- Pentru o bună performanță a testului, produsul liofilizat trebuie să fie afle la fundul tubului și să nu fie aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
- Un aspect al amestecului de reacție în format stabilizat, aflat în mod normal la fundul tubului, care este diferit de cel obișnuit (fără formă conică, neomogen, de dimensiune mai mare/mai mică și cu culoare alta decât alburie) nu afectează funcționalitatea testului.
- Calitatea testului depinde de calitatea probei; trebuie să fie extras acid nucleic de calitate din probele respiratorii.
- Acest test este un test calitativ și nu furnizează valori cantitative, nici nu indică numărul de organisme prezente.
- Pot fi detectate nivele extrem de joase ale țintei, aflate sub limita de detectare, însă rezultatele ar putea să nu fie reproductibile.
- Există o posibilitate de rezultate fals pozitive datorită contaminării încrucișate cu SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și/sau RSV, fie probele conținând concentrații înalte de ARN țintă sau contaminării datorită produselor PCR de la reacțiile precedente.
- Combinățiile specifice de primer și sondă pentru detectarea regiunilor conservate de genă N (SARS-CoV-2) utilizate în VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System au fost proiectate pe baza testului US CDC pentru detectarea specifică a SARS-CoV-2 prin amplificarea a două regiuni unice ale genei N. Acestea nu prezintă omologii combinate semnificative cu genomul uman, microflora umană, SARS-CoV sau alți coronaviri, care ar putea conduce la rezultate fals pozitive predictibile.
- Rezultatele fals negative pot apărea datorită mai multor factori și combinațiilor dintre aceștia, inclusiv:
 - Metode necorespunzătoare de recoltare, transport, depozitare și/sau manipulare a probelor.
 - Proceduri necorespunzătoare de procesare (inclusiv de extractie a ARN).
 - Degradarea ARN viral în cursul transportului/depozitării și/sau procesării probei.
 - Mutățiile sau polimorfismele în regiunile de legare ale primerului sau sondei pot afecta detectarea variantelor noi sau necunoscute de SARS-CoV-2, Flu și/sau RSV.
 - Încărcare virală a specimenului sub limita de detectare a testului.
 - Prezența inhibitorilor RT-qPCR sau a altor tipuri de substanțe interferente.
 - Nerespectarea instrucțiunilor de utilizare sau a procedurii de testare.
- În SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube o amplificare la un situs țintă singular sau chiar rezultate pozitive aleatorii sunt sugestive pentru un randament al amplificării ușor diferit al situsului țintă an genei N. Probele cu încărcare virală mică pot conduce la amplificare a țintei N unice. În cazul în care există dubii se recomandă trimiterea la un laborator de referință, pentru testări suplimentare.
- Unele probe (în SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube) ar putea să nu prezinte curbe de amplificare ale RNase P datorită numărului redus de celule umane în proba clinică originală. Un semnal IC negativ nu exclude prezența ARN-ului SARS-CoV-2, Flu și/sau RSV într-un specimen clinic.



- Un rezultat pozitiv al testului nu indică neapărat prezența virușilor viabili și nu înseamnă că acești viruși sunt infecțioși sau sunt agenții cauzatori pentru simptome clinice. Totuși, un rezultat pozitiv indică prezența sevențelor virale țintă.
- Rezultatele negative nu exclud infecția cu SARS-CoV-2, Flu și/sau RSV și nu trebuie utilizate ca unică bază pentru deciziile de tratament sau de gestionare a pacientului. Tipurile optime de specimen și reperele de timp pentru nivelurile virale maxime în cursul infecției cauzate de SARS-CoV-2 și noua tulipină de virus gripe A nu au fost determinate. Poate fi necesară recoltarea de probe multiple (ca tipuri și repere de timp) de la același pacient, pentru a detecta virusul.
- Dacă testele diagnostice pentru alte boli respiratorii sunt negative și prezentarea clinică a pacientului, împreună cu informațiile epidemiologice, sugerează că este posibilă infecția cu SARS-CoV-2, Flu și/sau RSV, trebuie luate în considerare existența unui rezultat fals negativ și retestarea pacientului.
- În cazul în care se obțin rezultate Nerezolvat, Nedeterminat sau Incomplet folosind VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, va fi necesară retestarea. Rezultatele Nerezolvat s-ar putea datora prezenței inhibitorilor în probă sau unei incorecte rehidratări a tubului cu amestec de reacție liofilizat. În cazul unei defecțiuni a instrumentului, vor fi obținute rezultatele Nedeterminat sau Incomplet.

11. Controlul de calitate

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System conține un control intern în fiecare Flu A, Flu B & RSV reaction tube și un control intern endogen în fiecare tub de reacție SARS-CoV-2 (N1 + N2)reaction tube, care confirmă efectuarea corectă a tehnicii.

12. Caracteristici de performanță

12.1. Sensibilitate și specificitate clinică

Performanța clinică a VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a fost testată individual în fiecare tub de reacție.

Performanța clinică a Flu A, Flu B & RSV reaction tube a fost testată folosind 344 probe respiratorii (tampon orofaringian) de la pacienți simptomatici. Aceste rezultate au fost comparate cu cele obținute cu o metodă de detecție moleculară (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Rezultatele au fost următoarele:



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

Tabelul 10 Rezultate comparative pentru Flu A.

Acordul pozitiv procentual este >96% iar acordul negativ procentual este >99%.

*Cantitatea mică de model ARN în această probă respiratorie este sub limita de detecție a metodei utilizate.

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

Tabelul 11 Rezultate comparative pentru Flu B.

Acordul pozitiv procentual este >99% iar acordul negativ procentual este >98%.

*Cantitatea mică de model ARN în această probă respiratorie este sub limita de detecție a metodei utilizate.

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

Tabelul 12 Rezultate comparative pentru RSV.

Acordul pozitiv procentual este >88% iar acordul negativ procentual este >99%.

*Cantitatea mică de model ARN în această probă respiratorie este sub limita de detecție a metodei utilizate.

Performanța clinică a SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube a fost testată folosind 254 de probe respiratorii (tampoane nasofaringiene în mediu de transport Vircell) de la pacienți cu suspiciune clinică de boală COVID-19 sau alte boli respiratorii similare. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute odată cu diagnosticul clinic efectuat cu testul Simplexa™ COVID-19 Direct assay, analiza discrepanței fiind efectuată cu protocolul Charité.



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

Tabelul 13 Rezultate comparative pentru SARS-CoV-2.

*Diagnosticul inițial al uneia din cele două probe a fost nevalid și raportat pacientului ca pozitiv pentru prevenire și perioadă de carantină.

SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube a detectat două probe pozitive care nu au fost detectate folosind testul Simplexa™ COVID-19 Direct assay și protocolul Charité.

Acordul pozitiv procentual (PPA) și acordul negativ procentual (NPA) pentru SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube sunt >99% și 98%, respectiv.

Rezultatele indică un nivel înalt de acord pentru detectarea virușilor SARS-CoV-2, Flu A, Flu B și/sau RSV utilizând VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilitate analitică

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System are o limită de detecție de ≥ 10 copii de genom per reacție pentru Flu A, ≥ 20 copii de genom per reacție pentru Flu B, ≥ 2 copii de genom per reacție pentru RSV și ≥ 5 copii de genom per reacție pentru SARS-CoV-2 cu o rată pozitivă de $\geq 95\%$ (Figurile 2, 3, 4, 5 și 6).

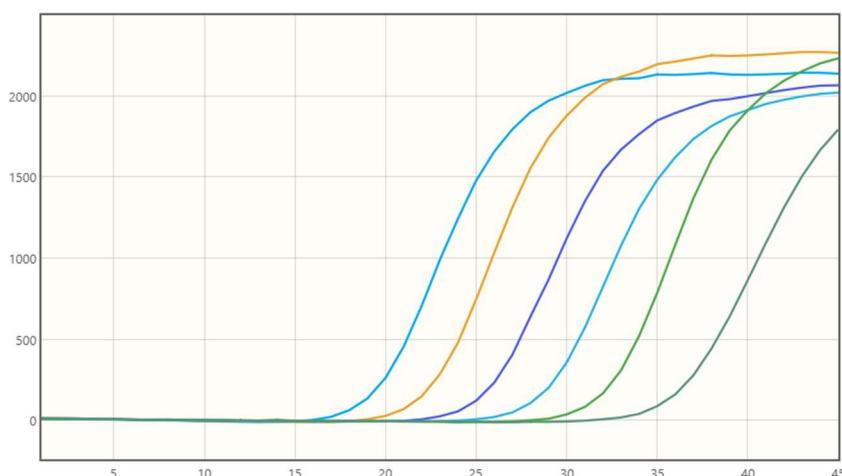
Figura 2. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale Flu A (2×10^6 - 2×10^1 copii per reacție) pe BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

Figura 3. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copii per reacție) pe BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

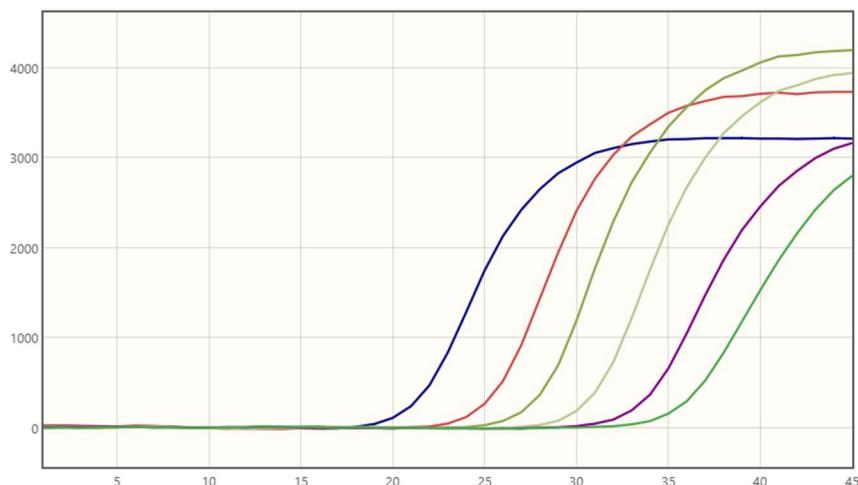


Figura 4. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale RSV (2×10^6 - 2×10^1 copii per reacție) pe BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).

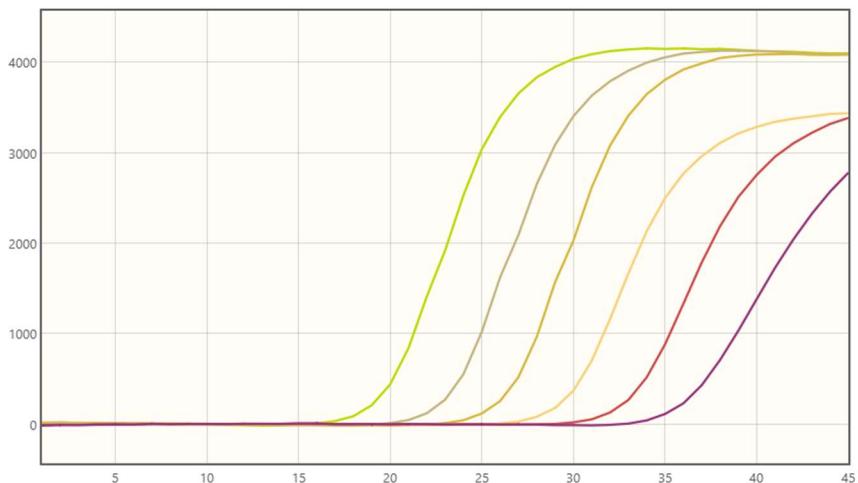


Figura 5. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \times 10^4$ - $9,9 \times 10^0$ și $5,0 \times 10^0$ copii de genom per reacție) pe BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

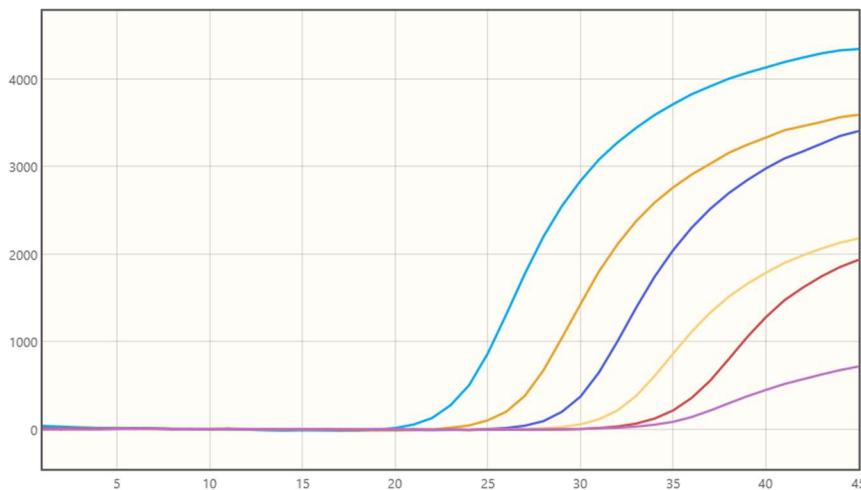
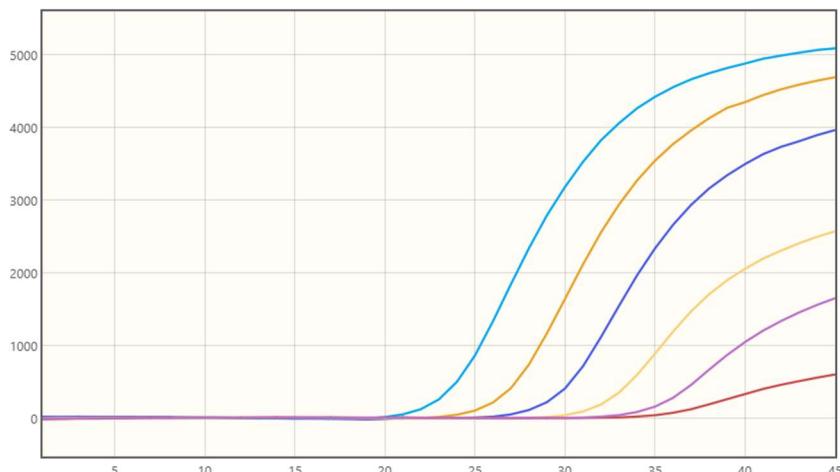


Figura 6. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale SARS-CoV-2 ($N_1 + N_2$) ($9,9 \times 10^4 - 9,9 \times 10^0$ și $5,0 \times 10^0$ copii de genom per reacție) pe BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



12.3. Specificitate analitică

Specificitatea testului pentru SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV a fost confirmată prin testarea unui panel constând din diverse microorganisme reprezentând cei mai frecvenți patogeni din domeniul respirator. Nu a fost detectată nicio reactivitate încrucișată între oricare dintre următoarele microorganisme testate, cu excepția patogenilor menținuți de fiecare test:

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



Testarea reactivității încrucișate					
Coronavirus MERS	-	Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)	- /+	Influenza B/Nevada/3/2011	-/+
Coronavirus SARS Tulpina Frankfurt 1	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clada 3C2a.1)	- /+	Influenza B/New Jersey/1/2012	-/+
SARS-CoV-2 tulipina BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	-/+	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C)	- /+	Influenza B/Texas/02/2013	-/+
SARS-CoV-2 tulipina 2019-nCoV/Italy-INMI1	-/+	Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)	- /+	Influenza B/Townsville/8/2016	-/+
SARS-CoV-2 izolat Australia/VIC01/2020	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)	- /+	Influenza B/Canberra/11/2016	-/+
SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1	-/+	Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)	- /+	Influenza B/Florida/4/2006	-/+
SARS-CoV-2 tulipina 2019nCoV/USA/WA1/2020	-/+	Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)	- /+	Influenza B/Florida/07/2004	-/+
Enterovirus 68 și 71	-	Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IDCDC-RG6 (H5N1)	- /+	Influenza B/Guangdong/120/2000	-/+
Enterovirus Echovirus 11 și 30	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)	- /+	Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)	-/+
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 și B3	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)	- /+	Influenza B/ Jiangsu/10/2003	-/+
Haemophilus influenzae MinnA	-	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a	- /+	Influenza B/Massachusetts/2/2012	-/+
Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)	- /+	Influenza B/Netherlands/365/2016 (clada 3)	-/+
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1)	- /+	Influenza B/Phuket/3073/2013	-/+
Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)	- /+	Influenza B/Texas/06/2011	-/+
Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1)	- /+	Influenza B/Wisconsin/1/2010	-/+
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/ Egypt /321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)	- /+	Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A	-/+
Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clada 6B.1)	-/+	Influenza A/ Egypt /3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)	- /+	Legionella bozemani	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-/+	Influenza A/ Egypt /N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29	- /+	Legionella dumoffii	-
Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	- /+	Legionella longbeachae	-
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30	- /+	Legionella micdadei	-
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IDCDC-RG7 (H5N1)	- /+	Legionella pneumophila	-



Testarea reactivității încrucișate						
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)	- /+	Metapneumovirus uman A și B	-	
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	- /+	Moraxella catarrhalis	-	
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)	- /+	Mycoplasma pneumoniae	-	
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)	- /+	Mycobacterium tuberculosis nerezistent la rifampicină	-	
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)	-/+	Influenza A/Whooper swan/R65/2006 (H5N1)	- /+	Viruși paragripali 1, 2, 3 și 4 umani	-	
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2)	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	- /+	Pneumocystis jirovecii Tip A1 și g885652	-	
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	-/+	Influenza A/duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)	- /+	Rinovirus uman tip C	-	
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-/+	Influenza A/duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4)	- /+	Staphylococcus aureus subsp. aureus	-	
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8)	- /+	Staphylococcus epidermidis	-	
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8)	- /+	Streptococcus pneumoniae Z022	-	
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	- /+	Streptococcus pyogenes	-	
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)	- /+	Streptococcus salivarius	-	
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	- /+	Virus respirator sincițial (RSV) A și B (tulpina CH93(18)-18)	-/+	
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	- /+	Virus respirator sincițial uman tulipina Long	-/+	
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)	- /+			

Tabelul 14 Microorganisme patogenice de referință utilizate în acest studiu.

12.4. Reactivitate analitică

Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pentru **SARS-CoV-2** a fost evaluată în raport cu ARN de la tulipina 2019-nCoV uman BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, tulipina 2019-nCoV uman 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 tulipina 2019nCoV/USA-WA1/2020, controale de ARN sintetic pentru două variante de virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 izolat Australia/VIC01/2020) și MN908947.3 (SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1), prezentând rezultat pozitiv.



Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pentru **virus gripal A** a fost evaluată în raport cu ARN extras de la următoarele tulpini: Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clada 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1), Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09, Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09, Influenza A/PR/8/34 (H1N1), Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2), Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2), Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2), Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2), Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2), Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2), Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2), Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2), Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clada 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clada 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2), Influenza A/New York/39/2012 (H3N2), Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2), Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2), Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2), Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2), Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2), Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clada 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C), Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2), Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2), Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2), Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1), Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1), Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1), Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1), Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1), Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1), Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1), Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1), Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1), Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1), Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1), Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1), Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1), Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1), Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1), Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3), Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clada 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8), Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8), Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2), Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7), Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9), Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9), Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2), Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2), Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2), Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26, prezentând rezultat pozitiv.

Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pentru **virus gripal B** a fost evaluată în raport cu ARN extras de la următoarele tulpini: Influenza B/Brisbane/60/2008, Influenza B/Colorado/6/2017, Influenza B/Malaysia/2506/2004, Influenza B/Maryland/15/2016, Influenza B/Netherlands/207/06, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clada 1A), Influenza B/Nevada/3/2011, Influenza B/New Jersey/1/2012, Influenza B/Texas/02/2013 , Influenza B/Townsville/8/2016 (**B/linia Victoria**); Influenza



B/Canberra/11/2016, Influenza B/Florida/4/2006, Influenza B/Florida/07/2004, Influenza B/Guangdong/120/2000, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39), Influenza B/Jiangsu/10/2003, Influenza B/Massachusetts/2/2012, Influenza B/Netherlands/365/2016 (clada 3), Influenza B/Phuket/3073/2013, Influenza B/Texas/06/2011, Influenza B/Wisconsin/1/2010, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A (**B/linia Yamagata**), prezentând rezultat pozitiv.

Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pentru **RSV** a fost confirmată în raport cu ARN extras de la RSV A și B (tulpina CH93(18)-18) și Virusul respirator sincițial uman tulpina Long, prezentând rezultat pozitiv.

13. Bibliography/ Bibliografie

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/. 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.

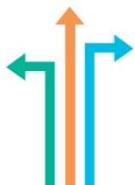


14. Symbols for IVD components and reagents/ Simboluri pentru componentele și reactivii IVD

IVD	<i>In vitro diagnostic device</i> Dispozitiv de diagnostic <i>in vitro</i>		Keep dry A se păstra la loc uscat		Use by Data de expirare		Manufacturer Producător	LOT	Batch code (Lot) Cod lot (Lot)
	Consult Instructions for Use Consultați instrucțiunile de utilizare		Temperature limitation Limită de temperatură		Contains sufficient for <n> test Conținut suficient pentru <n> teste	DIL	Sample diluent Diluent probă	REF	Catalognumber Număr catalog

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







CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC