

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Respiratory Virus Mix I
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / Diese Gebrauchsanleitung bezieht sich auf die folgende Referenz:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENZ
VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444219 / VS-SFR124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Verweis auf das mit dem BD MAX™ System zu verwendende Produkt.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Die Gebrauchsanweisung ist dem Kit in englischer/spanischer Sprache beigelegt.

EN For download IFUs from other languages, please enter in **certest.es/viasure/labeling**. Once you be there, follow the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en **certest.es/viasure/labeling**. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

DA For at downloade IFUS fra andre sprog, skal du gå ind på **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, bedes du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu **certest.es/viasure/labeling**. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur **certest.es/viasure/labeling**. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

NO For å laste ned IFUS fra andre språk, vennligst skriv inn i **certest.es/viasure/labeling**. Når du er der, følg instruksjonene for tilgang til språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, vennligst kontakt: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **certest.es/viasure/labeling**. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information kan du kontakta: viasure@certest.es.

TR IFUS'u diğer dillerden indirmek için lütfen **certest.es/viasure/labeling** adresine girin. Oraya girdikten sonra, lütfen ihtiyacınız olan dile erişim için talimatları takip edin. Daha fazla bilgiye ihtiyacınız varsa, lütfen viasure@certest.es adresinden iletişime geçin.

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Wenden Sie sich an viasure@certest.es, wenn Ihre Sprache nicht in der Liste enthalten ist.

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Hinweis: Der Anwender sollte den Hersteller und die zuständige Behörde des Mitgliedstaates, in dem er als Anwender und/oder Patient niedergelassen ist, über jeden schwerwiegenden Zwischenfall im Zusammenhang mit dem Produkt informieren.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	9
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	9
8.2.	Sample preparation and DNA extraction	10
8.3.	PCR protocol	10
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	15
11.	Quality control	16
12.	Performance characteristics.....	16
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	16
12.2.	Analytical sensitivity	17
12.3.	Analytical specificity	19
12.4.	Analytical reactivity	19

Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	21
2.	Zusammenfassung und Erläuterung	21
3.	Verfahrensprinzip.....	22
4.	Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	23
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung	24
6.	Transport- und Lagerbedingungen	24
7.	Sicherheitshinweise für Benutzer	24
8.	Testverfahren	25
8.1.	Probenentnahme, -lagerung und Transport	25
8.2.	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	26
8.3.	PCR-Protokoll	26

9.	Ergebnisinterpretation.....	30
10.	Grenzen des Tests.....	32
11.	Qualitätskontrolle	33
12.	Testeigenschaften.....	34
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität	34
12.2.	Analytische Empfindlichkeit	34
12.3.	Analytische Spezifität	36
12.4.	Analytische Reaktivität	37
	Bibliography/ Literaturverzeichnis.....	38
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien	39
	Trademarks.....	39

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in respiratory samples (nasopharyngeal swabs) from patients suspected of respiratory infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the identification of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) infection in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. 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 specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B).

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to Coronaviridae family. There are six coronavirus species known to cause human diseases. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV.

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2.

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever or chills, cough, fatigue, anorexia, myalgia and dyspnea. Less common symptoms are sore throat, nasal congestion, headache, diarrhea, nausea and vomiting. Loss of smell (anosmia) or loss of taste (ageusia) preceding the onset of respiratory symptoms has also been reported. Older adults and people who have severe underlying medical conditions like heart or lung disease or diabetes seem to be at higher risk for developing more serious complications from COVID-19 illness.

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) specimens collected mainly by a healthcare provider) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 and

other respiratory viruses, such as Influenza and RSV.

Influenza viruses belong to the Orthomyxoviridae family and cause the majority of viral lower respiratory tract infections. Influenza A and B are a significant cause of morbidity and mortality worldwide, considering that elderly and compromised individuals are especially at risk of developing severe illness and complications such as pneumonia. People feel some or all of these symptoms: fever or feeling feverish/chills, cough, sore throat, nasal stuffiness and discharge, myalgia, headaches, and anorexia. The influenza viruses can be spread from person to person in two different ways: through the air (large droplets and aerosols from sneezing and coughing), and by direct or indirect contact.

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

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

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

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in nasopharyngeal swabs. 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 a conserved region of *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (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.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2	475/520	<i>N</i> and <i>ORF1ab</i> gene
Influenza B	530/565	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
Influenza A	585/630	<i>Matrix</i> gene (<i>M1</i>)
RSV (A/B)	630/665	<i>N</i> gene
Endogenous Internal Control (EIC)	680/715	Human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Barcode	Amount
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	1K foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-SFR124 (444219).

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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 or 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- 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, the product 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 care 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 *Respiratory Virus Mix I* 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. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. 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 (BD MAX™ PCR Cartridge).
- 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, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, and disposal of samples.

- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs collected in sterile Vircell® transport medium or in sterile Virus transport and preservation medium (Biocomma®), and in Universal Transport Medium, depending on the sample. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of 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 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 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.

The clinical samples must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Sample preparation and DNA 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 400-750 µL of nasopharyngeal samples into a BD MAX™ ExK™ 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.

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 Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, 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 Respiratory Virus Mix I.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "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: 1K (concerning Respiratory Virus Mix I reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Table 3. 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.

10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	4.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	1.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	3.0	-	18.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	1.5	-

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

11) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 5).

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 5. PCR protocol.

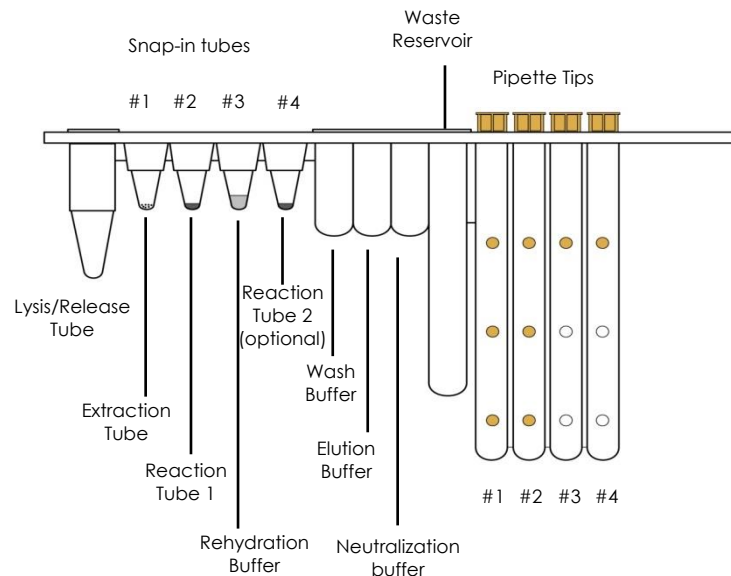
12) Click the "Save Test" button.

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 *Respiratory Virus Mix 1* reaction tubes (1K 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.

- b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different 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.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (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.
- a. 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 buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the “Work List” tab on the “Run” screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the “Test” drop down menu, select VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the “Save” button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).

- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). 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 that meets the setting criteria.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

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 table:

SARS-CoV-2 (475/520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Endogenous Internal Control (680/715)	Interpretation
+	+	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA detected ¹
-	+	+	+	+/- ¹	Flu B, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2 RNA not detected ¹
+	-	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and Flu B RNA not detected ¹
+	+	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) RNA detected and Flu A RNA not detected ¹
+	+	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A RNA detected and RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	+	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B RNA detected and Flu A, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A RNA detected and Flu B, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA detected and Flu B, Flu A RNA not detected ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Flu B, Flu A RNA detected and SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA not detected ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Flu B, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu A RNA not detected ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu B RNA not detected ¹
+	-	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2 RNA detected ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Influenza B RNA detected ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Influenza A RNA detected ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RSV RNA detected ¹
-	-	-	-	+ ²	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA not detected ²
-	-	-	-	- 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	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	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the endogenous internal control is positive (Ct less than 35). 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 following the indications below.

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 PCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

NOTE: New samples may be tested in the same run with repeat samples.

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 swabs.
- 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, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B), 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 the *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) used in VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, 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 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, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection or cutoff for the assay.

- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19, gripe and RSV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples 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, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable virus and does not imply that these virus are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of target viral sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of target *RNA* in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Respiratory Virus Mix I* 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 *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (EIC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with clinical suspicion of SARS-CoV-2, Flu A/B and or RSV A/B infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L. in collaboration with the Biobank of the Sistema de Salud de Aragón (BSSA) and the Microbiology and Parasitology Department of Hospital Universitario Central de Asturias	Nasopharyngeal swabs	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) or VIASURE SARS-CoV-2 Real time PCR Detection Kit, + subsequent whole genome sequencing	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0.977 (0.934-0.995)	0.998 (0.991-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test for use on the cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0.815-1)	1 (0.995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0.961 (0.865 – 0.995)	0.999 (0.992-1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0.929-1)	1 (0.995-1)

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Result show agreement to detect SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (A/B) using VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detection limit (LoD) results on nasopharyngeal samples with a positive rate of $\geq 95\%$ are as follows:

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 5.01 IU (International Units)/ μl for SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 1.8×10^2 CEID₅₀ (Median Chicken Embryo Infectious Dose)/ml for Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) /ml for Influenza A.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of 4 genome copies/ μl for RSVA and RSVB.

Note: The detection limit was calculated using a sample volume of 400 μl .

Examples of the amplification plots resulting from running an assay on the BD MAX™ System are shown below

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

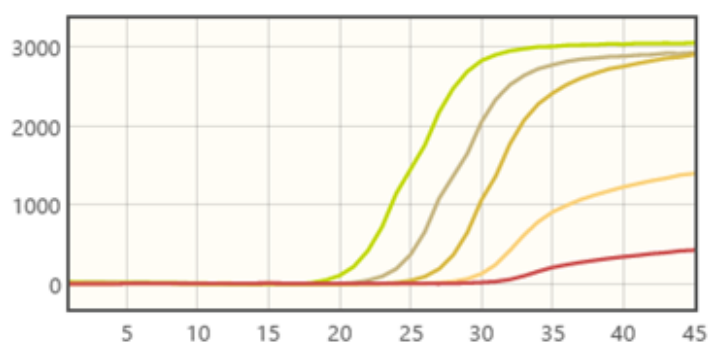


Figure 3. Dilution series of Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

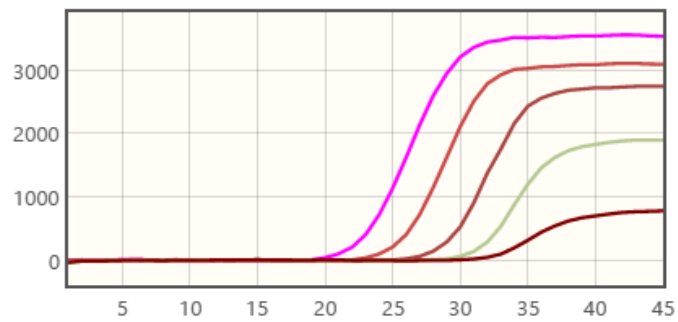


Figure 4. Dilution series of Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

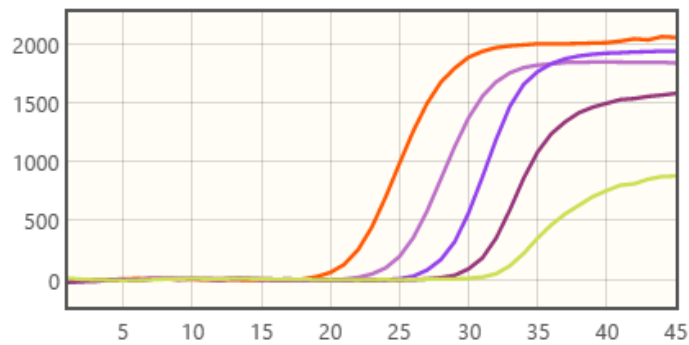


Figure 5. Dilution series of RSVA (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).

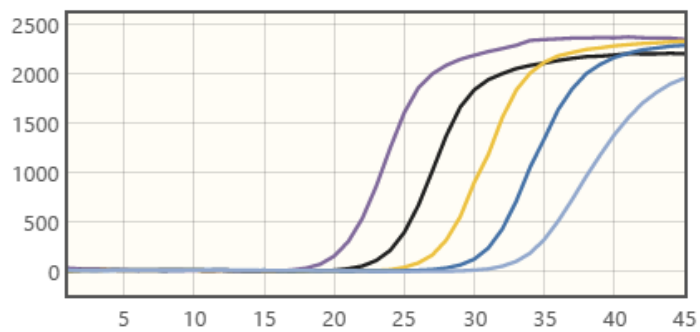
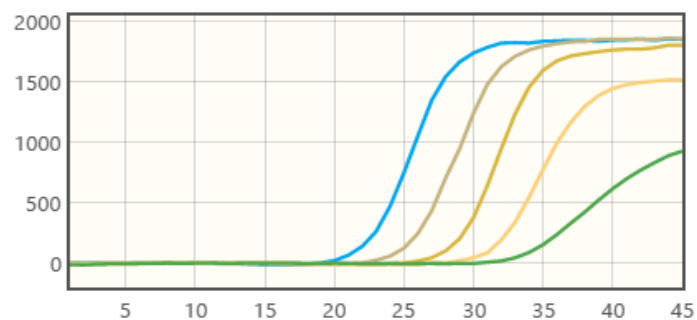


Figure 6. Dilution series of RSVB (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Respiratory Virus Mix I* 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:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Enterovirus 68, 71	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Human rhinovirus	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Human metapneumovirus A and B	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
MERS Coronavirus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **SARS-CoV-2** was evaluated against RNA extracted from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, synthetic RNA controls for MT007544.1 variant (SARSCoV2 isolate Australia/VIC01/2020), MN908947.3 variant (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), alpha variant (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), Beta variant (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), Gamma variant (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) and Kappa variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), and heat inactivated SARSCoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), and irradiated cell lysate from 2019-nCoV/USA-WA1/2020, and lyophilized cell lysates from BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 and BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza B** was evaluated against RNA extracted from the following strains: B/Phuket/3073/2013 virus, B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Florida/04/06 virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata Lineage), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Brisbane/3/2007 (Yamagata Lineage) virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria Lineage), B/Victoria/304/2006 (Victoria Lineage) virus, B/Bangladesh/3333/2007 (Yamagata Lineage) virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **Influenza A** was evaluated against RNA extracted from the following strains: A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8) virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus,

A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09) virus, A/California/7/2009 (H1N1) virus, A/California/7/2009 (H1N1pdm09) virus, A/South Australia/55/2014 virus, Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175 virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B virus, Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) virus, Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) virus, Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147 virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148 virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173 virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 virus, A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A virus, A/Victoria/2570/2019 IVR-215 virus and A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224 virus, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System for **RSV** was evaluated against RNA extracted from Respiratory Syncytial Virus A (strain A-2) and Respiratory Syncytial Virus B (strain 9320), showing positive results.

DEUTSCH

1. Verwendungszweck

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist ein automatisierter Echtzeit-RT-PCR-Kit, der zum qualitativen Nachweis der RNA von SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A und RSV (Typ A und B) in nasopharyngealen Abstrichen von Patienten mit Verdacht auf eine Atemwegsinfektion durch ihren Arzt vorgesehen ist. Dieser Test soll die Identifizierung von SARS-CoV -2, Influenza B, Influenza A und/oder RSV (Typ A und B) Infektionen bestimmt in Kombination mit den klinischen Symptomen und epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten erleichtern. Der Assay nutzt das BD MAX™ System zur automatisierten RNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln für das BD MAX™ System. Dazu wird RNA aus Proben extrahiert und komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese wird durch RT-PCR amplifiziert und mithilfe von Sonden nachgewiesen, die mit fluoreszierenden Reporter-Farbstoffen markiert und für SARS-CoV -2, Influenza B, Influenza A und/oder RSV (Typ A und B) spezifisch sind.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

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

Im Dezember 2019 trat bei einigen Personen, die im Großhandelsmarkt Huanan für Meeresfrüchte in Wuhan in der Provinz Hubei, China, arbeiteten oder in dessen Umgebung wohnten, eine Lungenentzündung unbekannter Ursache auf. Die Analyse der Atemwegsproben von Erkrankten durch Tiefensequenzierung wies auf ein neuartiges Coronavirus hin, das zunächst als „2019 neuartiges Coronavirus (2019-nCoV)“ und später als „SARS-CoV2“ bezeichnet wurde.

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

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

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

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

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

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

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

3. Verfahrensprinzip

VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist zum qualitativen Nachweis der RNA von SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A und RSV (Typ A und B) in nasopharyngealen Abstrichen vorgesehen.

Der Nachweis erfolgt per Echtzeit-RT-PCR-Verfahren in einem Schritt. Die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz erfolgen dabei in demselben Reaktionsgefäß. Das isolierte RNA-Target wird durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA transkribiert, woraufhin die Amplifikation und der Nachweis einer konservierten Region des *N*- und des *ORF1ab*-Gens von SARS-CoV-2, des *M1*-Gens von Influenza B, des *M1*-Gens von Influenza A und des *N*-Gens von RSV (Typ A und B) mithilfe spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden erfolgen.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase, Reverse Transkriptase) in stabilisierter Form sowie eine endogene interne Kontrolle zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität. Der Assay nutzt ein bei Menschen vorkommendes Housekeeping-Gen – das humane *RNase P*-Gen – als endogene interne Kontrolle (EIC). Humane Housekeeping-Gene sind an den grundlegenden Zellerhaltungsfunktionen beteiligt. Daher wird davon ausgegangen, dass sie in allen kernhaltigen menschlichen Zellen vorliegen und relativ konstante Expressionsniveaus zeigen.

Zielsequenz	Kanal	Gen
SARS-CoV-2	475/520	<i>N</i> - und <i>ORF1ab</i> -Gen
Influenza B	530/565	<i>Matrix</i> -Gen (<i>M1</i>)
Influenza A	585/630	<i>Matrix</i> -Gen (<i>M1</i>)
RSV (A/B)	630/665	<i>N</i> -Gen
Endogene interne Kontrolle (EIC)	680/715	Humanes <i>RNase P</i> -Gen

Tabelle 10. Zielsequenz, Kanal und Gene.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien:

Reagenz/Material	Beschreibung	Barcode	Menge
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und einer endogenen internen Kontrolle in stabilisierter Form	1K-Folie	2 Beutel mit je 12 transparenten Röhrchen
Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	1I-Folie	1 Beutel mit je 24 transparenten Röhrchen

Tabelle 11. Reagenzien und Materialien im VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit der Kat.-Nr. VS-SFR124 (444219).

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der nachstehenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.-Nr.:442828 oder 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Kartuschen) (Ref.-Nr.: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl)
- Nuklease-freies Wasser
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel, die die Reaktionsgefäße enthalten, kann das Produkt bis zu 28 Tage lang verwendet werden.

7. Sicherheitshinweise für Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für den Gebrauch durch professionelle Anwender bestimmt, beispielsweise Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und Techniker, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, das BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderliche Reagenzien und das BD MAX™

System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen die Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) und Desoxyribonuklease (DNase). Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen (BD MAX™ PCR Cartridge) müssen die Handschuhe gewechselt werden.

- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für VIASURE Real Time PCR Detection Kits aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da Stoffe und/oder Gemische, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die GefahrenEinstufung erfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch zum BD MAX™ System.

8. Testverfahren

8.1. Probenentnahme, -lagerung und Transport

The VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde an Nasopharyngealabstrichen getestet, die, je nach Probe, in sterilem Vircell® Transportmedium, in sterilem Virus Transport and Preservation Medium (Biocomma®) bzw. in Universal Transport Medium, entnommen wurden. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind Atemwegsabstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten Gefäß mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität

so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material und nicht länger als 72 Stunden bei 2 bis 8 °C transportiert werden. Für den Langzeittransport (über 72 Stunden) empfehlen wir Temperaturen von -20 °C oder darunter. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 2 bis 8 °C bis zu 72 Stunden lang oder zur Konservierung bei -20 °C oder idealerweise bei -70 °C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

Die klinischen Proben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines). Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> und der IDSA-Leitlinie (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

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

1. Pipettieren Sie 400- 750 µl der nasopharyngealen Proben in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube und verschließen Sie das Gefäß mit einem Septumverschluss. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.

8.3. PCR-Protokoll

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

8.3.1. Anlegen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie bereits den Test für das VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System angelegt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt mit Schritt 8.3.2 fortfahren.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).

- 3) Benennen Sie in der Registerkarte mit den grundlegenden Informationen im Fenster „Test Name“ (Testname) Ihren Test, d. h.: *VIASURE Respiratory Virus Mix I*.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. Wählen Sie in einem solchen Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert), und stellen Sie das Probenvolumen auf 950 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder höher verwenden und barcodierte Folien-Snap-in-Röhrchen einsetzen, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Kundendefinierte Barcodes) die folgende Konfiguration:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Barcode für Snap-In 2): 1K (betreffend *Respiratory Virus Mix I* reaction tube (Reaktionsgefäß)).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (für das Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode (Barcode für Snap-In 4): ein weiteres Reaktionsgefäß (andersfarbige Folie), wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) wählen (Abschnitt 8.3.1).
- 9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 3).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen VIASURE for BD MAX™ Test verwendet werden. In einem solchen Fall sind die PCR-Einstellungen und Testschritte für die Einrastposition 2 (grün) und Einrastposition 4 (blau) einzugeben.

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Influenza B	80	150	0	40
585/630 (ROX)	Influenza A	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	RSV (A/B)	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	EIC	80	150	0	35

Tabelle 12. „PCR settings“ (PCR-Einstellungen).

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

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

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)				
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	4,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	1,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	3,0	-	18,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	1,5	-

Tabelle 13. Parameter für das „Spectral Cross Talk“ (spektrale Übersprechen).

11) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 5) ein.

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

Tabelle 14. PCR-Protokoll.

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

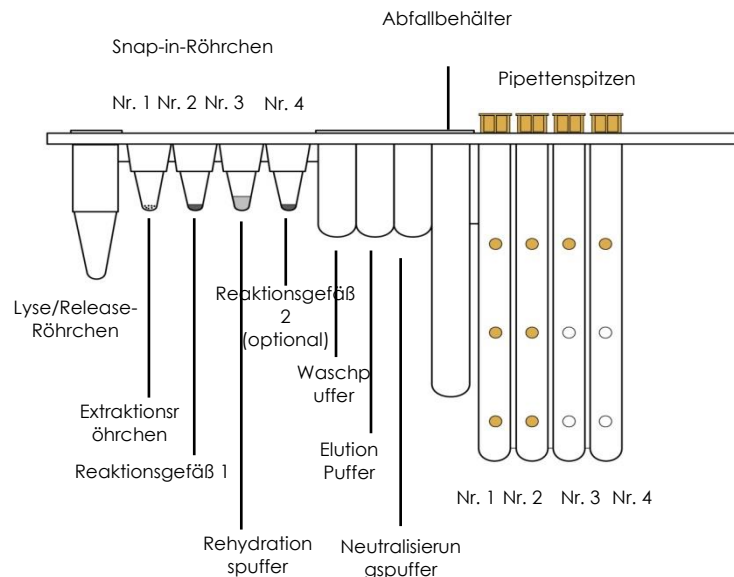
8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Unitized Reagent Strip (Einzel-Reagenzstreifen) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (Extraktionsröhrchen, B4, weiße Folie) aus den Schutzbeuteln. Lassen Sie das bzw. die Extraction Tube(s) – weiße Folie – in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack; Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die erforderliche Anzahl an *Respiratory Virus Mix 1* reaction tube (Reaktionsgefäßen) (1K-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
 - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit

Rehydrationspuffer (Typ 5)) (Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen VIASURE Reaktionsgefäßen (andersfarbige Folie) und lassen Sie sie in die entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack; Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.

- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydration Buffer tubes (11-Folie), und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack; Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
 - a. Achten Sie für eine korrekte Überführung bitte darauf, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich der gesamte Puffer am Boden des Röhrchens befindet.

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



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VIASURE Respiratory Virus Mix I (falls nicht bereits erstellt, siehe Abschnitt 8.3.1).
- 3) Wählen Sie (optional) im Auswahlm Menü die entsprechende Chargennummer des Kits (zu finden an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits).
- 4) Erfassen Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus, und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Vergewissern Sie sich, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Sample Buffer Tube Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).

- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.4. BD MAX™ Bericht

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

9. Ergebnisinterpretation

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

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

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 3). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat, der die festgelegten Kriterien erfüllt.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 6 auszuwerten.

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

Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle abzulesen und auszuwerten:

SARS-CoV-2 (475/ 520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/ 655)	Endogene interne Kontrolle (680/715)	Interpretation
+	+	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-B-, Flu-A- und RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen ¹
-	+	+	+	+/- ¹	Flu-B-, Flu-A- und RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und SARS-CoV-2-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	-	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-A-, RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und Flu-B-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	+	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-B- und RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und Flu-A-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	+	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-B-, Flu-A-RNA nachgewiesen und RSV-(A/B)-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	+	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-B-RNA nachgewiesen und Flu-A-, RSV-(A/B)-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	-	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2-, Flu-A- RNA nachgewiesen und Flu B, RSV-(A/B)-RNA nicht nachgewiesen ¹
+	-	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2-, RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und Flu-B-, Flu-A-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Flu-B-, Flu-A-RNA nachgewiesen und SARS-CoV-2-, RSV-(A/B)-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Flu-B-, RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und SARS-CoV-2-, Flu-A-RNA nicht nachgewiesen ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Flu-A-, RSV-(A/B)-RNA nachgewiesen und SARS-CoV-2-, Flu-B- RNA nicht nachgewiesen ¹
+	-	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2-RNA nachgewiesen ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Influenza-B-RNA nachgewiesen ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Influenza-A-RNA nachgewiesen ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RSV-RNA nachgewiesen ¹
-	-	-	-	+ ²	SARS-CoV-2-, Flu-B-, Flu-A- und RSV-(A/B)-RNA nicht nachgewiesen ²
-	-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten. ²
IND	IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmtes Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 15. Probenauswertung.

+: Amplifikation erfolgt.

-: Keine Amplifikation erfolgt.

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

2 Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die endogene interne Kontrolle jedoch positiv ist (Ct kleiner als 35). Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden. Wenn im Fall eines ungelösten Ergebnisses (UNR) bei einer negativen Probe das Signal der internen Kontrolle ausbleibt, wird empfohlen, den Assay entsprechend den folgenden Angaben zu wiederholen.

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

HINWEIS: Neue Proben können im selben Durchlauf wie die Wiederholungsproben getestet werden.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für entnommene nasopharyngeale Abstriche validiert.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Es besteht die Möglichkeit falsch-positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination mit SARS-CoV-2-, Influenza-B-, Influenza-A- oder RSV-Sequenzen, entweder durch Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-RNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die Kombinationen spezifischer Primer und Sonden für den Nachweis *N*- und des *ORF1ab*-Gens von SARS-CoV-2, des *M1*-Gens von Influenza B, des *M1*-Gens von Influenza A und des *N*-Gens von RSV (Typ A und B), die im

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System verwendet werden, zeigen keine signifikanten kombinierten Homologien mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora oder andere Atemwegskeimen, die zu vorhersehbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:
 - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion);
 - Abbau der RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-, Influenza-B-, Influenza-A- oder RSV-Varianten beeinträchtigen können;
 - eine Organismenlast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
 - das Vorliegen von qPCR-Inhibitoren oder anderen Arten von Störsubstanzen; der Einfluss von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Antibiotika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, die zur Prävention einer COVID-19-, Grippe- oder RSV-Infektion oder zur Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurde nicht untersucht;
 - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Einige Proben ergeben wegen einer zu geringen Zellzahl in der klinischen Originalprobe u. U. keine Amplifikationskurven für *RNase P*. Ein negatives IC-Signal schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A oder RSV-(A/B) in einer klinischen Probe nicht aus.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Viren vorliegen oder dass diese Viren infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit viraler Zielsequenzen hin.
- Wenn diagnostische Tests auf andere Atemwegserkrankungen negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine SARS-CoV-2- Influenza-B-, Influenza-A- oder RSV-Infektion möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
- Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von Zielsequenz-RNA in einer klinischen Probe nicht aus. Wenn klinische Befunde, die Anamnese des Patienten und epidemiologische Informationen auf eine SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A oder RSV-(A/B)-Infektion hindeuten, sollte ein erneuter Test mit einem höheren Probenvolumen erwogen werden.
- Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmbar (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine Testwiederholung erforderlich. Unklare Ergebnisse (UNR) können durch Hemmsubstanzen in der Probe oder eine nicht korrekte Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbar oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Reaktionsgefäß eine endogene interne Kontrolle (EIC), mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde mit klinischen Proben (Nasopharyngealabstrichen) von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Infektion mit SARS-CoV-2, Flu A/B und/oder RSV A/B getestet. Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Standort	Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	CerTest Biotec S.L. in Zusammenarbeit mit der Biobank des Sistema de Salud de Aragón (BSSA), Spanien, und der Abteilung für Mikrobiologie und Parasitologie des Hospital Universitario Central de Asturias, Spanien	Nasopharyngealabstrich ²	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Tabelle 16. Ort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Wahr positive und wahr negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte sowie Sensitivität und Spezifität beim VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurden in Relation zu verschiedenen Vergleichstests berechnet, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist:

Standort	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) oder VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, + anschließende Ganzgenom-Sequenzierung	SARS-CoV-2	127	625	1	3	0.977 (0.934-0.995)	0.998 (0.991-1)
	Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic acid test zur Verwendung auf dem cobas® Liat® System (cobas® Influenza A/B & RSV)	Influenza B	18	738	0	0	1 (0.815-1)	1 (0.995-1)
		Influenza A	49	704	1	2	0.961 (0.865-0.995)	0.999 (0.992-1)
		RSV (A/B)	50	706	0	0	1 (0.929-1)	1 (0.995-1)

Tabelle 17. Richtig-positive (TP) und negative Werte (TN), falsch-positive (FP) und negative (FN) Werte, Sensitivität, Spezifität für das VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Die Ergebnisse zeigen Übereinstimmung in Bezug auf den Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A und RSV (A/B) mit dem VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Ergebnisse für das VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System bezüglich der Nachweisgrenze Ergebnisse auf nasopharyngealen Proben bei einer Positivrate $\geq 95\%$ lauten wie folgt:

- Die Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System liegt bei 5,01 IU (Internationale Einheiten)/ μ l für SARS-CoV-2.
- Die Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System liegt bei $1,8 \times 10^2$ CEID₅₀ CEID (Mediane infektiöse Dosis für Hühnerembryonen)/ml für Influenza B.
- Die Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System liegt bei $10^{-0.5}$ TCID₅₀ (Mediane infektiöse Dosis für Gewebekulturen)/ml für Influenza A.

- d) Die Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System liegt bei 4 Genomkopien/μl für RSVA und RSVB.

Hinweis: Die Nachweisgrenze wurde unter Verwendung eines Probenvolumens von 400 μl bestimmt.

Beispiele vor die Amplifikationskurven, die bei Durchführung eines Assays auf dem BD MAX™ System erhalten wurden, sind nachstehend gezeigt.

Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines SARS-CoV-2-Templates (5×10^5 – 5×10^0 Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

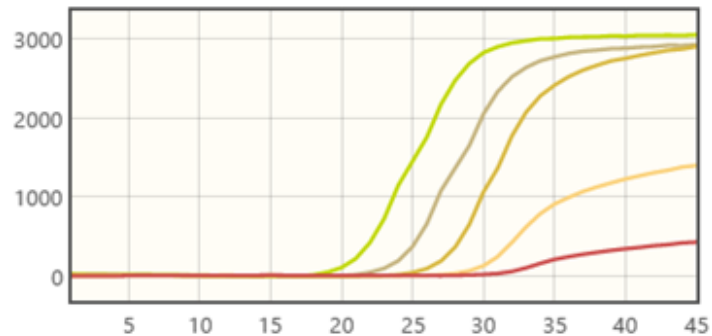


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines Influenza-B-Templates (5×10^5 – 5×10^0 Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 530/565 (HEX)).

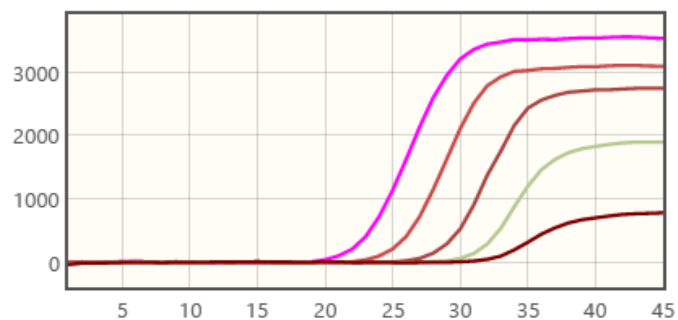


Abbildung 4. Verdünnungsreihe eines Influenza-A-Templates (5×10^5 – 5×10^0 Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 585/630 (ROX)).

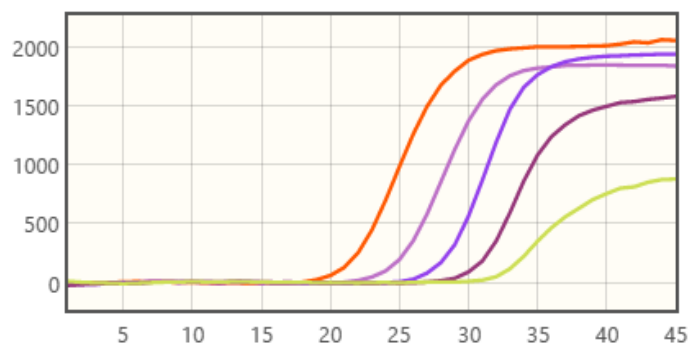


Abbildung 5. Verdünnungsreihe eines RSV-A-Templates (5×10^5 – 5×10^0 Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 630/665 (CY5)).

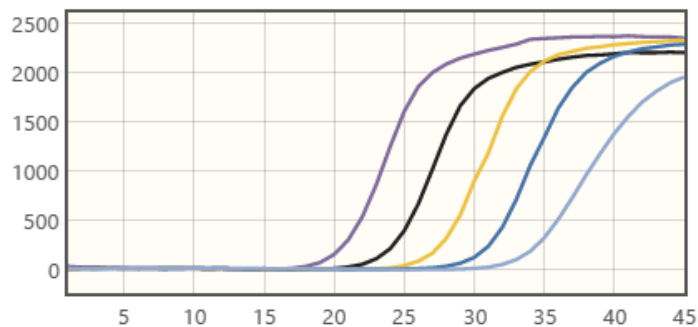
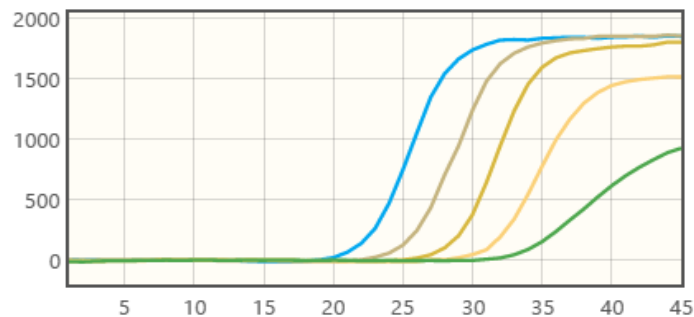


Abbildung 6. Verdünnungsreihe eines RSV-B-Templates (5×10^5 – 5×10^0 Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 630/665 (CY5)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des *Respiratory Virus Mix I*-Assays wurde bestätigt durch Testen eines Panels von verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen konnte eine Kreuzreaktivität festgestellt werden:

Test auf Kreuzreaktionen					
Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 und B3	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Enterovirus 68, 71	-	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4	-
Bordetella holmesii	-	Haemophilus influenzae MinnA	-	Pneumocytis jirovecii Typ A1 und g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Legionella bozemanii	-	Humanes Rhinovirus	-
Bordetella pertussis	-	Legionella dumoffii	-	SARS Coronavirus Stamm Frankfurt 1	-
Chlamydia caviae	-	Legionella longbeachae	-	Staphylococcus aureus	-
Chlamydia psittaci Genotyp A und C	-	Legionella micdadei	-	Staphylococcus epidermidis	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Legionella pneumophila	-	Streptococcus pneumoniae	-
Humanes Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-	Streptococcus pyogenes	-
MERS-Coronavirus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus salivarius	-

Tabelle 18. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **SARS-CoV-2** wurde überprüft anhand von RNA, die aus den folgenden Quellen extrahiert wurde: Human 2019-nCoV Stamm BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV Stamm 2019-nCoV/Italy-INMI1, synthetische RNA-Kontrollen für die MT007544.1-Variante (SARS-CoV-2-Isolat Australia/VIC01/2020), MN908947.3-Variante (SARS-CoV-2-Isolat Wuhan-Hu-1), Alpha-Variante (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), Beta-Variante (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), Gamma-Variante (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) und Kappa-Variante (B.1.617.1 Indien/CT-ILSGS00361/2021), hitze-inaktiverter SARS-CoV-2-Stamm 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), bestrahltes Zellysat von 2019-nCoV/USA-WA1/2020, lyophilisierte Zellysate von BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 und BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **Influenza B** wurde überprüft anhand von RNA, die aus den folgenden Stämmen extrahiert wurde: B/Phuket/3073/2013 Virus, B/Brisbane/60/2008 Virus, Influenza B/Florida/04/06 Virus, B/Pennsylvania/7/2007 (Yamagata-Linie), B/Santiago/4364/2007 (Yamagata-Linie) Virus, B/Brisbane/3/2007 (Yamagata-Linie) Virus, B/Pennsylvania/5/2007 (Victoria-Linie), B/Victoria/304/2006 (Victoria-Linie) Virus, B/Bangladesch/3333/2007 (Yamagata-Linie) Virus, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Die Reaktivität des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **Influenza A** wurde überprüft anhand von RNA, die aus den folgenden Stämmen extrahiert wurde: A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) Virus, A/Thüringen/5/2017 (H3N2) Virus, A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016(H5N8) Virus, A/Anhui/1/2013 (H7N9) Virus, A/Michigan/45/2015 (H1N1 pdm09) Virus, A/California/7/2009 (H1N1) Virus, A/California/7/2009 (H1N1pdm09) Virus, A/South Australia/55/2014 Virus, Switzerland/9715293/2013 (H3N2) IVR-175 Virus, A/Singapore/GP1908/2015 IVR-180 Virus, A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B Virus, Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) Virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) Virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) Virus, A/Hawaii/31/2007 (H1N1) Virus, A/Qatar/1123/2007 (H1N1) Virus, A/Cambodia/0371/2007 (H1N1) Virus, Influenza A Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) Virus, Influenza A Virus, A/Taiwan/760/2007 (H3N2) Virus, Influenza A Virus, A/Texas/71/2007 (H3N2) Virus, A/Brisbane/10/2007 (H3N2) IVR-147 Virus, A/Brisbane/59/2007 (H1N1) IVR-148 Virus, A/South Dakota/6/2007 (H1N1) X-173 Virus, A/California/07/2009 (H1N1)pdm09 Virus, A/California/08/2009 (H1N1)pdm09 Virus, A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 Virus, A/Mexico/4108/2009 (H1N1)pdm09 Virus, A/California/07/2009 (H1N1 pdm09) NYMC X-179A Virus, A/Victoria/2570/2019 IVR-215 Virus und A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224 Virus, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.











Die Reaktivität des VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für **RSV** wurde überprüft anhand von RNA, die aus dem Respiratorischen Synzytialvirus A (Stamm A-2) und dem Respiratorischen Synzytialvirus B (Stamm 9320) extrahiert wurde, wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

Bibliography/ Literaturverzeichnis

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1>
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>
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>
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>
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>
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-primerprobes.pdf>
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>
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-testingstrategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>
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/
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.

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

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device <i>In-vitro</i>-Diagnostikum</p>	 <p>Keep dry Trocken aufbewahren</p>	 <p>Use by Verfallsdatum</p>	 <p>Manufacturer Hersteller</p>	 <p>Batch code (Lot) Chargennummer</p>
 <p>Consult instructions for use Siehe Gebrauchsanweisung</p>	 <p>Temperature limitation Temperaturbegrenzung</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)</p>	 <p>Unique Device Identification Eindeutige Produktidentifikation</p>	 <p>Catalognumber Katalognummer</p>

Trademarks

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

Change Control / Änderungshistorie		
Version No. / Versionsnr	Changes / Änderungen	Date / Datum
00	Original version / Ursprüngliche Version.	25/07/2022
01	"Spectral Cross Talk" values of table 4 have been updated / "Spectral Cross Talk"-Werte der Tabelle 4 wurden aktualisiert	02/08/2022

Table A 2. Control change table/ Tabelle zur Änderungshistorie.

Revision: 02nd August 2022.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02