

**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 / Estas instrucciones de uso aplican para la siguiente referencia:

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIA
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. / Referencia del producto para ser utilizado con el Sistema BD MAX™.

**NOTE:** Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.

**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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:viasure@certest.es) adresinden iletişime geçin.

Contact [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) if your language is not on the list / Contacte con [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) si su idioma no está en la lista.

*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.*

*Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.*

## 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

## Contenido

1.	Uso previsto.....	21
2.	Introducción y explicación .....	21
3.	Procedimiento.....	22
4.	Reactivos suministrados.....	23
5.	Material requerido y no suministrado .....	24
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento.....	24
7.	Precauciones para el usuario .....	24
8.	Procedimiento del test .....	25
8.1.	Recolección, transporte y almacenamiento de muestras .....	25
8.2.	Preparación de la muestra y extracción de DNA.....	26
8.3.	Protocolo PCR .....	26

---

9.	Interpretación de resultados.....	30
10.	Limitaciones del test .....	32
11.	Control de calidad .....	33
12.	Características del test .....	33
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica .....	33
12.2.	Sensibilidad analítica .....	34
12.3.	Especificidad analítica .....	36
12.4.	Reactividad analítica .....	36
	Bibliography/Bibliografía .....	38
	Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	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.

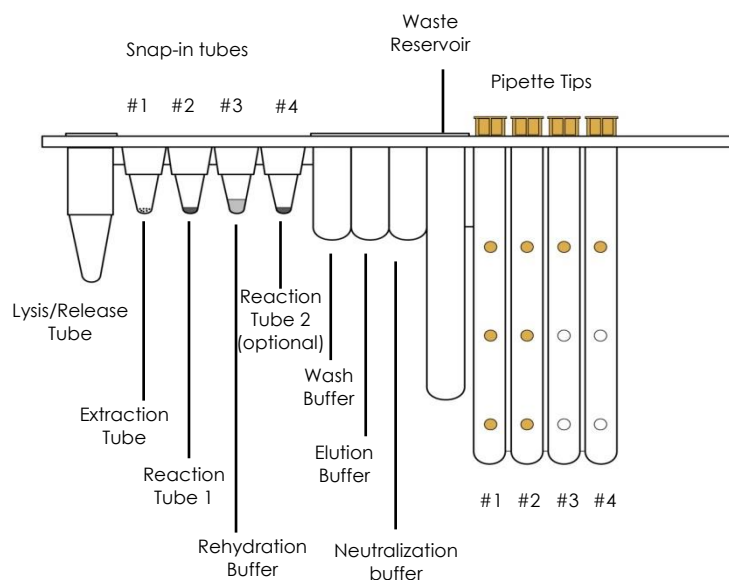
12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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).
  - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- 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
+	+	+	+	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA detected <sup>1</sup>
-	+	+	+	+/- <sup>1</sup>	Flu B, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2 RNA not detected <sup>1</sup>
+	-	+	+	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and Flu B RNA not detected <sup>1</sup>
+	+	-	+	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) RNA detected and Flu A RNA not detected <sup>1</sup>
+	+	+	-	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A RNA detected and RSV (A/B) RNA not detected <sup>1</sup>
+	+	-	-	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu B RNA detected and Flu A, RSV (A/B) RNA not detected <sup>1</sup>
+	-	+	-	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, Flu A RNA detected and Flu B, RSV (A/B) RNA not detected <sup>1</sup>
+	-	-	+	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA detected and Flu B, Flu A RNA not detected <sup>1</sup>
-	+	+	-	+/- <sup>1</sup>	Flu B, Flu A RNA detected and SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA not detected <sup>1</sup>
-	+	-	+	+/- <sup>1</sup>	Flu B, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu A RNA not detected <sup>1</sup>
-	-	+	+	+/- <sup>1</sup>	Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu B RNA not detected <sup>1</sup>
+	-	-	-	+/- <sup>1</sup>	SARS-CoV-2 RNA detected <sup>1</sup>
-	+	-	-	+/- <sup>1</sup>	Influenza B RNA detected <sup>1</sup>
-	-	+	-	+/- <sup>1</sup>	Influenza A RNA detected <sup>1</sup>
-	-	-	+	+/- <sup>1</sup>	RSV RNA detected <sup>1</sup>
-	-	-	-	+ <sup>2</sup>	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA not detected <sup>2</sup>
-	-	-	-	- <sup>2</sup>	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. <sup>2</sup>
IND	IND	IND	IND	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)/ $\mu\text{l}$  for SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of  $1.8 \times 10^2$  CEID<sub>50</sub> (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  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub> (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/ $\mu\text{l}$  for RSVA and RSVB.

Note: The detection limit was calculated using a sample volume of 400  $\mu\text{l}$ .

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 ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

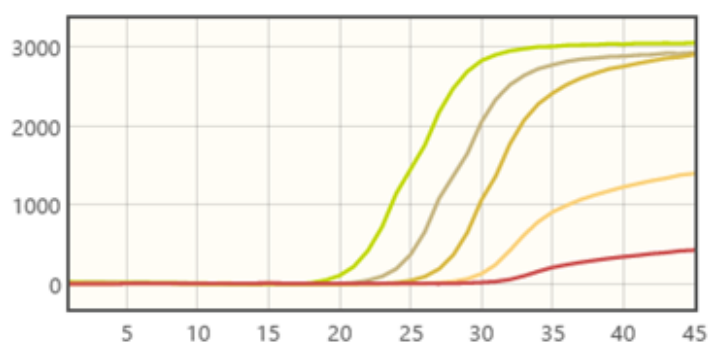


Figure 3. Dilution series of Influenza B ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

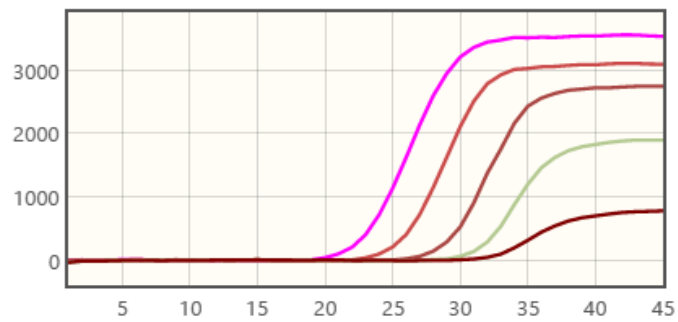


Figure 4. Dilution series of Influenza A ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

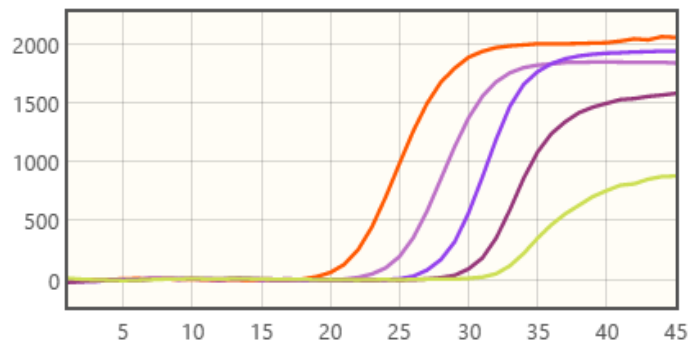


Figure 5. Dilution series of RSVA ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).

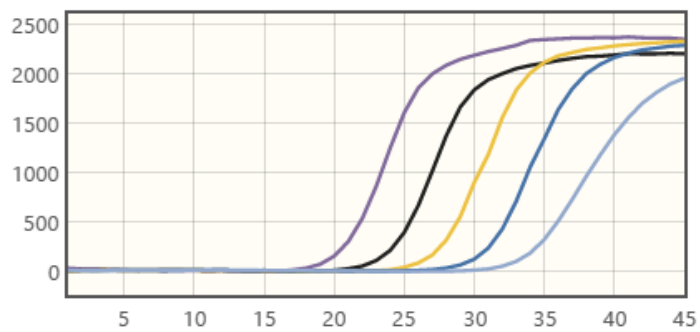
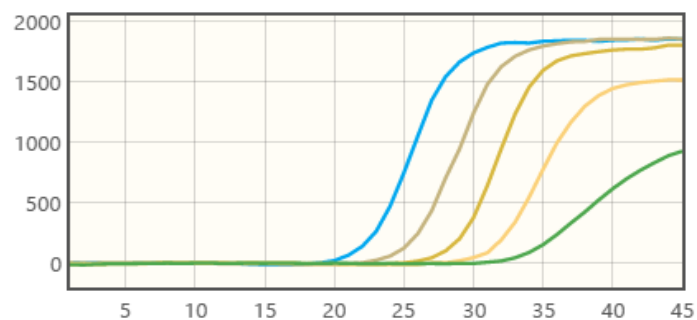


Figure 6. Dilution series of RSVB ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).



### 12.3. Analytical specificity

The specificity of the *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.

## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System es una prueba de RT-PCR en tiempo real automatizada diseñada para la detección cualitativa del RNA de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (tipos A y B) en muestras respiratorias (hisopos nasofaríngeos) procedentes de pacientes con sospecha de infección respiratoria por su profesional de la salud. El uso previsto del test es ayudar en la identificación de la infección por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (tipos A y B) en combinación con los signos y síntomas clínicos de los pacientes y los factores de riesgo epidemiológicos. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción automatizada del RNA y posterior RT-PCR a tiempo real utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El RNA es extraído de las muestras, y posteriormente, el DNA complementario (cDNA) es sintetizado y amplificado en un solo paso mediante RT-PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (tipos A y B).

### 2. Introducción y explicación

Los coronavirus son virus envueltos de RNA de cadena positiva no segmentados que pertenecen a la familia Coronaviridae. Se conocen seis especies de coronavirus que causan enfermedades humanas: cuatro virus (229E, OC43, NL63 y HKU1) que causan síntomas de resfriado común, y otros dos (coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo grave- severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV-, y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio - Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV-) que son zoonóticos y producen complicaciones más severas. SARS-CoV y MERS-CoV han causado más de 10.000 casos acumulados en las últimas dos décadas, con unas tasas de mortalidad del 34% para MERS-CoV y 10% para SARSCoV.

En diciembre de 2019, algunas personas que trabajaban o vivían alrededor del mercado de mariscos de Huanan en Wuhan, provincia de Hubei, China, presentaron neumonía de causa desconocida. El análisis de secuenciación masiva de las muestras respiratorias mostró un nuevo coronavirus, que fue llamado inicialmente como 2019 nuevo coronavirus (2019-nCoV) y posteriormente como SARS-CoV-2.

Se ha confirmado la transmisión de persona a persona del SARS-CoV-2, incluso durante el período de incubación en asintomáticos, y el virus puede causar enfermedad respiratoria severa como la producida por el SARS-CoV. Aunque la neumonía es la principal enfermedad asociada, algunos pacientes han desarrollado neumonía severa, edema pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda o fallo multiorgánico y muerte. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) creen que los síntomas del SARS-CoV-2 pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 tras la exposición, siendo los más comunes fiebre o escalofríos, tos, fatiga, anorexia, mialgia y disnea. Aquellos síntomas menos comunes son dolor de garganta, congestión nasal, dolor de cabeza, diarrea, náuseas y vómitos. También se ha descrito pérdida del olfato (anosmia) o pérdida del gusto (ageusia) antes del inicio de los síntomas respiratorios. Los adultos mayores y las

personas con afecciones médicas subyacentes graves, como enfermedad cardíaca o pulmonar o diabetes, parecen tener un mayor riesgo de desarrollar complicaciones más graves de la enfermedad COVID-19.

CDC recomienda para la identificación de SARS-CoV-2 y otros virus respiratorios como Influenza y RSV muestras del tracto respiratorio superior (frotis nasofaríngeos (NP) y orofaríngeos (OP), frotis nasales de la zona media del cornete nasal, frotis nasal, lavado/aspirado nasofaríngeo o muestras de lavado/aspiración nasal (NW) recolectadas principalmente por un profesional de la salud) y/o muestras de las vías respiratorias inferiores (esputos, aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad respiratoria más grave).

Los virus Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae y causan la mayor parte de las infecciones víricas del tracto respiratorio inferior. Influenza A y B son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, considerando que las personas de edad avanzada y comprometidas están especialmente en riesgo de desarrollar enfermedades graves y complicaciones como la neumonía. Las personas con influenza, sienten alguno o todos estos síntomas: fiebre o sensación febril/escalofríos, tos, dolor de garganta, congestión y secreción nasal, mialgia, dolor de cabeza, y anorexia. El virus influenza se puede transmitir de persona a persona de dos maneras diferentes: a través del aire (gotas y aerosoles que se producen al toser y estornudar), y por contacto directo o indirecto.

El genoma de los virus de Influenza A y B está formado por ocho segmentos de RNA monocatenario que codifican 11 o 12 proteínas virales. La envoltura viral, derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, consiste en una bicapa lipídica que contiene proteínas transmembrana, como hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y proteínas de la matriz M1 y M2. Influenza A se clasifica en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas “HA” y “NA”, mientras que Influenza B se divide en 2 linajes antigénica y genéticamente distintos, Victoria y Yamagata.

El virus Respiratorio Sincitial humano A y B (RSV) pertenece a la familia Paramyxoviridae y son los agentes causales virales más importantes de las infecciones respiratorias agudas. RSV es un virus envuelto cuyo genoma consiste en un RNA monocatenario lineal de sentido negativo (ssRNA-) no segmentado. El virus Respiratorio Sincitial humano es el principal agente causante de infecciones respiratorias como bronquitis, neumonía y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, pudiendo afectar a toda la población en un amplio rango de edad. Los pacientes afectados a menudo sienten algunos o todos estos síntomas: rinorrea, fiebre de bajo grado, tos, dolor de garganta, dolor de cabeza, y sibilancias. RSV se puede transmitir a través de gotitas de secreciones nasales que se expulsan al toser o estornudar. Esas gotas entran en contacto directo o mediante auto-inoculación tras tocar superficies contaminadas con las membranas mucosas de ojos, nariz y boca.

El diagnóstico clínico puede ser problemático, ya que un gran número de agentes patógenos causales de infecciones respiratorias agudas dan lugar a cuadros clínicos similares. La PCR a Tiempo Real es el método de diagnóstico de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y RSV preferentemente utilizado al ser una de las herramientas diagnósticas más sensibles y específica.

### 3. Procedimiento

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System está diseñado para la detección cualitativa del RNA de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (tipos A y B) en hisopos nasofaríngeos. La detección se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana,

produciéndose ambas reacciones en el mismo tubo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente, la identificación de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (tipos A y B) se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con una región conservada de los genes *N* y *ORF1ab* de SARS-CoV-2, el gen *M1* de Influenza B, el gen *M1* de Influenza A y el gen *N* de RSV (tipos A y B).

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana, la cual se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene en cada tubo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un control interno endógeno para monitorizar el proceso de extracción y/o la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano *housekeeping* como Control Interno Endógeno (CIE) (gen *RNasa P* presente en el DNA humano). Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
SARS-CoV-2	475/520	Gen <i>N</i> y <i>ORF1ab</i>
Influenza B	530/565	Gen de la matriz ( <i>M1</i> )
Influenza A	585/630	Gen de la matriz ( <i>M1</i> )
RSV (A/B)	630/665	Gen <i>N</i>
Control Interno endógeno (CIE)	680/715	Gen <i>RNasa P</i> humano

Tabla 1. Diana, canal y genes.

## 4. Reactivos suministrados

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Código de barras	Cantidad
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Sellado 1K	2 sobres de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Sellado 11	1 sobre de 24 tubos transparentes

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con Cat. N.º. VS-SFR124 (444219).

## 5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442828 o 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Agua libre de nucleasas
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

## 6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El kit puede usarse hasta 28 días después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción.

## 7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Proteger y conservar los componentes alejados de la luz.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, el kit



de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, el transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.

## 8. Procedimiento del test

### 8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha sido testado en hisopos nasofaríngeos recogidos en medio de transporte estéril Vircell® o en medio estéril de transporte y conservación viral (Biocomma®), y en medio de transporte universal, dependiendo de la muestra. Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores

limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados a 2-8°C hasta 72 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 72 horas, se recomienda realizar el envío a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 2-8°C hasta 72 horas o pueden congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  o idealmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>), la guía IDSA (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) y 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. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3. Hay que puntualizar que otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo. La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario.

1. Pipetear 400-750  $\mu\text{L}$  de muestras nasofaríngeas en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón con septo. Asegurar que se mezcla completamente vorteadando la muestra 1 minuto a alta velocidad. Proceder con BD MAX™ System Operation.

## 8.3. Protocolo PCR

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

### 8.3.1. Programación de la prueba VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" (Correr) del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor" (Editor de prueba).
- 2) Hacer click en el botón "Create" (Crear).

- 3) En la pantalla de "Basic Information" (Información básica), en la ventana "Test Name" (Nombre del test), escribir el nombre del test: ej. VIASURE *Respiratory Virus Mix I*.
- 4) En el menú desplegable "Extraction Type" (Tipo de extracción), seleccionar "ExK TNA-3".
- 5) En el menú desplegable "Master Mix Format" (Formato master mix), elegir "Type 5" (Tipo 5).
  - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) En "Sample extraction parameters" (Parámetros de extracción de muestra) seleccionar "User defined" (Definido por usuario) y ajustar el volumen de la muestra a 950 µL.
- 7) En "Ct Calculation" (Cálculo Ct) seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Análisis de Ct con cruce del umbral).
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior y se tienen tubos con sellado con código de barras, en "Custom Barcodes" (Códigos de barra personalizados) seleccionar la siguiente configuración:
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras): 1K (en relación a *Respiratory Virus Mix I* reaction tube)
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras): 11 (en relación a Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras): otro tubo de reacción (sellado diferente) si se elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1) (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5).
- 9) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings" (Configuración de los canales), "Gains" (Ganancias) y "Threshold" (Umbral) (Tabla 3).
  - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso completar "PCR Settings" y "Test Steps" para ambas posiciones, 2 (verde) y 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganancia)	Threshold (Umbral)	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)	CIE	80	150	0	35

Tabla 3. PCR settings (Configuración PCR).

Nota: Se recomienda establecer como valor mínimo de partida de *threshold* los indicados anteriormente para cada canal. Sin embargo, el usuario final debe ajustar los valores de *threshold* finales durante la interpretación del resultado para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal.

- 10) En la pestaña "PCR settings" (Configuración PCR) introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Cross-talk espectral) (Tabla 4).

		False Receiving Channel (Canal de falsa recepción)				
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel (Canal de excitación)	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	-

Tabla 4. Parámetros "Spectral cross-talk" (Cross-talk espectral).

11) En la pestaña "Test Steps" (Pasos de la prueba), introducir el protocolo de PCR (Tabla 5).

Step Name (Nombre de la etapa)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Reverse transcription (transcripción inversa)	Choque térmico	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Desnaturalización inicial)	Choque térmico	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturalización y alineamiento/extensión (recogida de datos))	2-Temperaturas	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabla 5. Protocolo PCR.

12) Hacer click en el botón "Save Test" (Guardar prueba).

### 8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

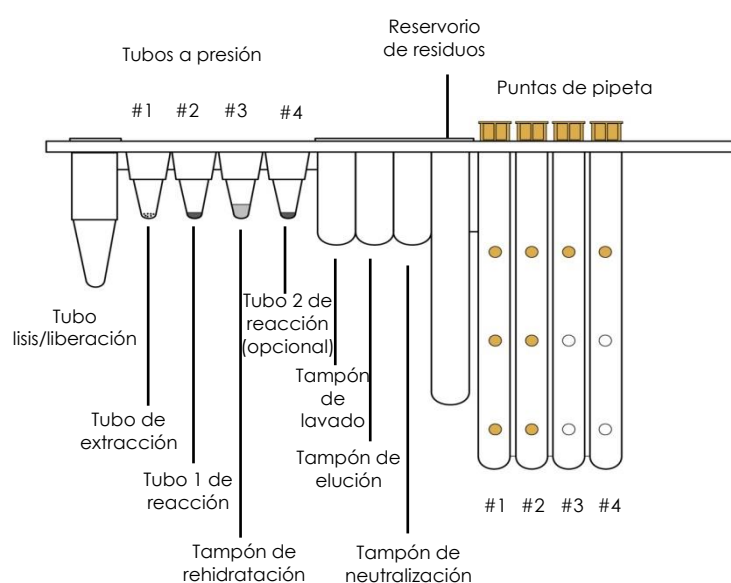
- 1) Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción (BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- 2) Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protectora. Colocar el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- 3) Calcular y separar el número adecuado de *Respiratory Virus Mix I* reaction tube (sello 1K) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver Figura 1).
  - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
  - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Nota: Si elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1) (MM liofilizada concentrada Master Mix dual con tampón de rehidratación – Tipo 5), calcular y separar el número adecuado de tubos de reacción

de los test VIASURE adicionales (sellado de color diferente) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 4. Código de color azul en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.

- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
  - a. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA) del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" (Lista de trabajo) en la pantalla "Run" (Correr) utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test" (Test), seleccionar VIASURE *Respiratory Virus Mix 1* (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del "Sample Buffer Tube" (Tubo de tampón de muestra) en la ventana de "Sample tube" (Tubo de muestra) dentro de la pestaña "Work List" (Lista de trabajo), ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir "Specimen/Patient ID" (identificación de la muestra/paciente) y/o "Accession" (Acceso) en la pestaña "Work List" (Lista de trabajo) y haga clic en el botón "Save" (Guardar). Continúe hasta que se introduzcan todos los tubos de tampón de muestra. Asegúrese de que la identificación muestra/paciente y los tubos de tampón de muestra estén correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.

- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" (Empezar a correr) para comenzar con el procedimiento.

### 8.3.4. Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results" (Resultados).
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view" (Ver).
- 3) Hacer click en el botón "Print" (Imprimir), seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalles de ejecución, detalles de prueba y gráfica ...).
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" (Imprimir o Exportar) de la pantalla "Run Report" (Sacar informe).

## 9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 3). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación que cumpla los criterios de configuración.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en la Tabla 6.

Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando la siguiente tabla:

SARS-CoV-2 (475/520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Control Interno endógeno (680/715)	Interpretación
+	+	+	+	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu B, Flu A y RSV (A/B) detectado <sup>1</sup>
-	+	+	+	+/-1	RNA Flu B, Flu A, RSV (A/B) detectado y RNA SARS-CoV-2 no detectado <sup>1</sup>
+	-	+	+	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) detectado y RNA Flu B no detectado <sup>1</sup>
+	+	-	+	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) detectado y RNA Flu A no detectado <sup>1</sup>
+	+	+	-	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu B, Flu A, detectado y RNA RSV (A/B) no detectado <sup>1</sup>
+	+	-	-	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu B detectado y RNA Flu A, RSV (A/B) no detectado <sup>1</sup>
+	-	+	-	+/-1	RNA SARS-CoV-2, Flu A detectado y RNA Flu B, RSV (A/B) no detectado <sup>1</sup>
+	-	-	+	+/-1	RNA SARS-CoV-2, RSV (A/B) detectado y RNA Flu B, Flu A no detectado <sup>1</sup>
-	+	+	-	+/-1	RNA Flu B, Flu A detectado y RNA SARS-CoV-2, RSV (A/B) no detectado <sup>1</sup>
-	+	-	+	+/-1	RNA Flu B, RSV (A/B) detectado y RNA SARS-CoV-2, Flu A no detectado <sup>1</sup>
-	-	+	+	+/-1	RNA Flu A, RSV (A/B) detectado y RNA SARS-CoV-2, Flu B no detectado <sup>1</sup>
+	-	-	-	+/-1	RNA SARS-CoV-2 Detectado <sup>1</sup>
-	+	-	-	+/-1	RNA Influenza B Detectado <sup>1</sup>
-	-	+	-	+/-1	RNA Influenza A Detectado <sup>1</sup>
-	-	-	+	+/-1	RNA RSV (A/B) Detectado <sup>1</sup>
-	-	-	-	+2	RNA SARS-CoV-2, Flu B, Flu A y RSV (A/B) no detectado <sup>2</sup>
-	-	-	-	-2	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación <sup>3</sup>
IND	IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 6. Interpretación.

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

**1** Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40. El Control Interno Endógeno (CIE) puede mostrar o no una señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno endógeno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

**2** Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control

interno. En caso de obtener un resultado sin resolver (UNR), ausencia de la señal de control interno en muestras negativas, se recomienda repetir el ensayo siguiendo las indicaciones que se detallan a continuación.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

NOTA: Se pueden probar en el mismo ensayo muestras nuevas y muestras repetidas.

El resultado de la prueba debe ser en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

## 10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con hisopos nasofaríngeos.
- Para obtener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras respiratorias.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con RNA de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de los genes *N* y *ORF1ab* de SARS-CoV-2, el gen *M1* de Influenza B, el gen *M1* de Influenza A y el gen *N* de RSV (tipos A y B) empleada en el test *VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit* no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana u otros microorganismos respiratorios, que pudieran originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
  - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
  - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de RNA).
  - Degradación del RNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.



- Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de nuevas o desconocidas cepas de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B).
- Niveles de organismo en la muestra por debajo del límite de detección o valor de corte del ensayo.
- La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir COVID-19, gripe o RSV o durante el tratamiento de la infección.
- No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Algunas muestras pueden no presentar curvas de amplificación de *RNasa P* debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original. Una señal del CI negativa no impide la presencia de SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B) en una muestra clínica.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias virales diana.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Resultados negativos no excluyen la presencia del RNA diana en una muestra clínica. Si las observaciones clínicas, el historial del paciente y la información epidemiológica sugieren infección por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A o RSV (A/B), se debería considerar volver a analizar la muestra aumentando el volumen de partida.
- En el caso de obtener con VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System resultados no resueltos, indeterminados o incompletos, se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

## 11. Control de calidad

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un Control Interno Endógeno (CIE) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System fue evaluada empleando muestras clínicas (hisopos nasofaríngeos) de pacientes con sospecha clínica de infección por SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A y RSV (A/B). En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado:

	Centro	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	CerTest Biotec S.L. en colaboración con el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA) y el departamento de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Central de Asturias	Hisopo nasofaríngeo	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Tabla 7. Resumen de los centros, tipos de muestra, flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas y dianas.

Los valores positivo y negativo, falso positivo y falso negativo, sensibilidad y especificidad para VIASURE Real Time Respiratory Virus Mix I PCR Detection Kit for BD MAX™ System se calcularon en relación a cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) o 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)

Tabla 8. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad y especificidad para VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Estos resultados muestran una concordancia para detectar SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (A/B) utilizando VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Sensibilidad analítica

Los resultados obtenidos al calcular el límite de detección (LoD) de VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección (LoD) en muestras nasofaríngeas con una tasa positiva  $\geq 95\%$  son los siguientes:

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección (LoD) de 5,01 UI (Unidades Internacionales)/ $\mu$ l para SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección (LoD) de  $1,8 \times 10^2$  CEID<sub>50</sub> (Median Chicken Embryo Infectious Dose)/ml para Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección (LoD) de  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub> (Median Tissue Culture Infectious Dose)/ml para Influenza A.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección (LoD) de 4 copias genómicas/ $\mu$ l para RSVA y RSVB.

Nota: El límite de detección se ha calculado con un volumen de muestra de 400  $\mu$ l.

A continuación se muestran ejemplos de las curvas de amplificación obtenidas en un ensayo en el sistema BD MAX™.

Figura 2. Diluciones seriadas de SARS-CoV-2 ( $5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^0$  copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

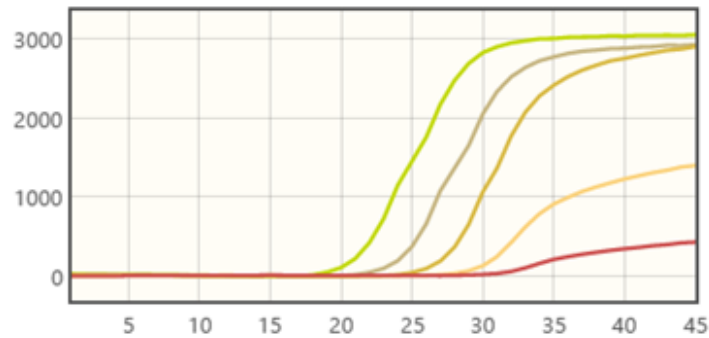


Figura 3. Diluciones seriadas de Influenza B ( $5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^0$  copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

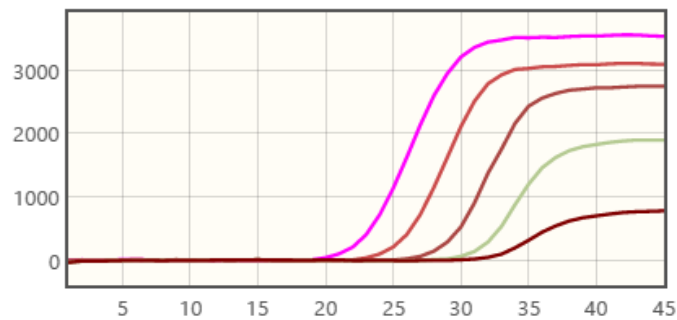


Figura 4. Diluciones seriadas de Influenza A ( $5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^0$  copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

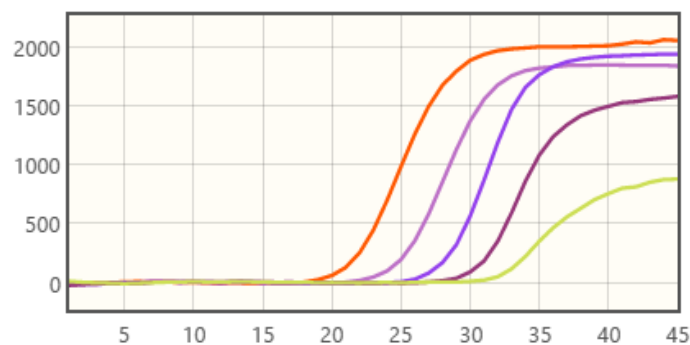


Figura 5. Diluciones seriadas de RSVA ( $5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^0$  copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 630/665 (CY5)).

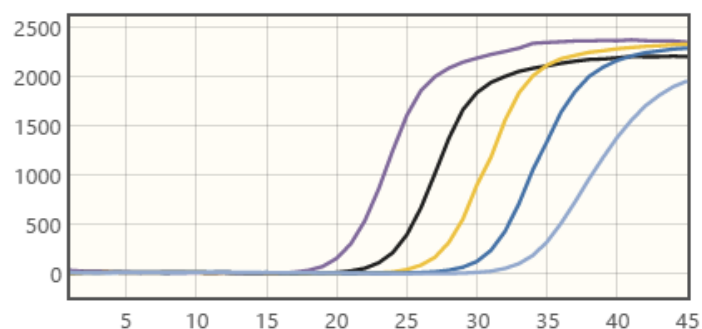
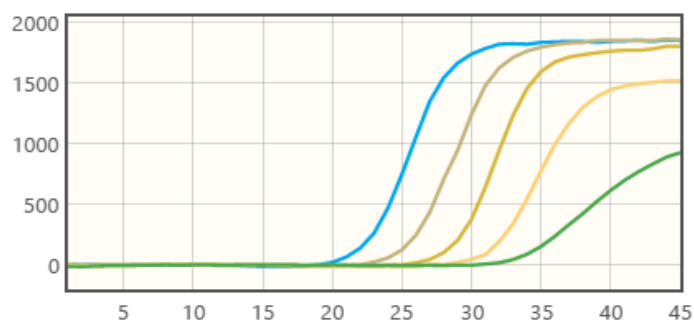


Figura 6. Diluciones seriadas de RSVB ( $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^0$  copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 630/665 (CY5)).



### 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Respiratory Virus Mix I* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados:

Cross-reactivity testing					
Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Enterovirus Echovirus 30	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Enterovirus 68, 71	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 y 4 virus	-
Bordetella holmesii	-	Haemophilus influenzae MinnA	-	Pneumocystis jirovecii Tipo A1 y g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Legionella bozemanii	-	Rhinovirus humano	-
Bordetella pertussis	-	Legionella dumoffii	-	SARS Coronavirus cepa Frankfurt 1	-
Chlamydia caviae	-	Legionella longbeachae	-	Staphylococcus aureus	-
Chlamydia psittaci genotype A y C	-	Legionella micdadei	-	Staphylococcus epidermidis	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Legionella pneumophila	-	Streptococcus pneumoniae	-
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	-	Metapneumovirus humano A y B	-	Streptococcus pyogenes	-
Coronavirus MERS	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus salivarius	-

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

### 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **SARS-CoV-2** se evaluó frente a RNA extraído de Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV cepa 2019-nCoV/Italy-INM11, controles sintéticos de RNA para la variante MT007544.1 (SARSCoV2 isolate Australia/VIC01/2020), variante MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), variante alpha (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), variante Beta (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), variante Gamma (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) y variante Kappa varant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), y SARSCoV-2 cepa 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™) inactivado por calor, y lisado de células irradiadas de 2019-

nCoV/USA-WA1/2020, y lisado de células liofilizadas de BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 y BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza B** se evaluó frente a RNA extraído de las siguientes cepas: 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, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza A** se evaluó frente a RNA extraído de de las siguientes cepas: /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, mostrando un resultado positivo.











La reactividad de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **RSV** se evaluó frente a RNA extraído de Virus Respiratorio Sincitial (cepa A-2) y Virus Respiratorio Sincitial (cepa 9320), mostrando un resultado positivo.

## Bibliography/Bibliografía

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/](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/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 <b>IVD</b> <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	 <b>LOT</b> Batch code (Lot) Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 <b>UDI</b> Unique Device Identification Identificación única de dispositivo	 <b>REF</b> Catalognumber Número de referencia

### Trademarks

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

<b>Change Control / Control de Cambios</b>		
<b>Version No. / Versión nº</b>	<b>Changes / Cambios</b>	<b>Date / Fecha</b>
00	Original version / Versión original.	19/05/2022
01	"Spectral Cross Talk" values of table 4 have been updated / Se han actualizado los valores de compensación de color ("Spectral Cross Talk") de la tabla 4	02/08/2022

Table A 2. Control change table/ Tabla de control de cambios.

Revision: 02<sup>nd</sup> 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev02