

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 / Ces consignes d'utilisation s'appliquent à la référence suivante :

PRODUCT / PRODUIT	REFERENCE / RÉFÉRENCE
VIASURE Respiratory Virus Mix / 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. / Référence du produit à utiliser avec le BD MAX™ System.

NOTE: Instructions for use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / Les instructions d'utilisation (IFU) sont incluses dans le kit en Version anglaise/espagnole.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contact viasure@certest.es if your language is not on the list / Contactez viasure@certest.es si votre langue ne figure pas sur la liste.

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.

Remarque : L'utilisateur doit notifier au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel il est établi en tant qu'utilisateur et/ou patient tout incident grave lié au produit.

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

Table des matières

1.	Utilisation prévue	21
2.	Résumé et explication	21
3.	Procédé	22
4.	Réactifs fournis.....	23
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur.....	24
6.	Conditions de transport et de stockage	24
7.	Précautions pour les utilisateurs	24
8.	Protocole de test.....	25
8.1.	Prélèvement, stockage et transport des échantillons.....	25
8.2.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN	26
8.3.	Protocole PCR	26

9.	Interprétation des résultats.....	30
10.	Limitations du test.....	32
11.	Contrôle qualité	33
12.	Caractéristiques du test.....	33
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques.....	33
12.2.	Sensibilité analytique	34
12.3.	Spécificité analytique.....	36
12.4.	Réactivité analytique	37
	Bibliography/ Bibliographie.....	38
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs	39
	Trademarks.....	39

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

other respiratory viruses, such as Influenza and RSV.

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A and RSV (types A and B) in nasopharyngeal swabs. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase, which is followed by the amplification of a conserved region of *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (EIC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442828 or 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Nuclease-free water.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

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

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

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

8.2. Sample preparation and DNA extraction

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

1. Pipette 400-750 µL of nasopharyngeal samples into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR protocol

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

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE Respiratory Virus Mix I.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher and have barcoded foil snap-in tubes, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1K (concerning Respiratory Virus Mix I reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

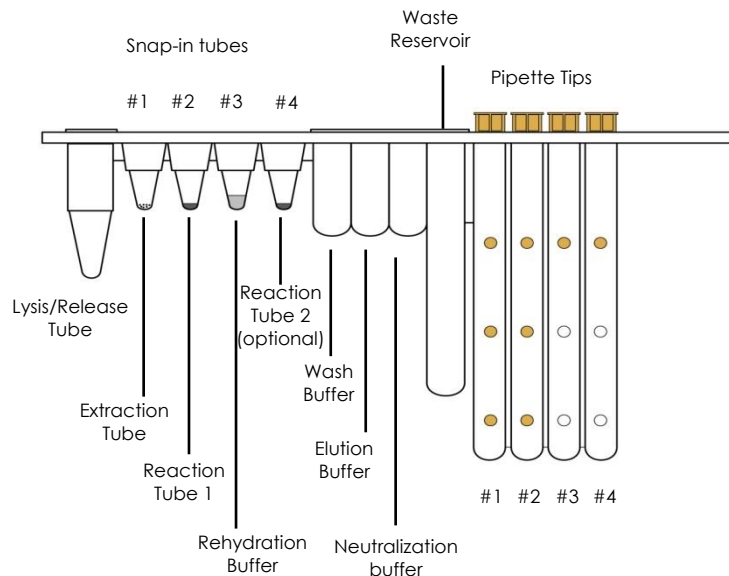
12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of *Respiratory Virus Mix 1* reaction tubes (1K foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.

- b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- i. Note: If you choose the format “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
- a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred that meets the setting criteria.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

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

Results should be read and analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 (475/520)	Flu B (530/565)	Flu A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Endogenous Internal Control (680/715)	Interpretation
+	+	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA detected ¹
-	+	+	+	+/- ¹	Flu B, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2 RNA not detected ¹
+	-	+	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) RNA detected and Flu B RNA not detected ¹
+	+	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) RNA detected and Flu A RNA not detected ¹
+	+	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A RNA detected and RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	+	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu B RNA detected and Flu A, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	+	-	+/- ¹	SARS-CoV-2, Flu A RNA detected and Flu B, RSV (A/B) RNA not detected ¹
+	-	-	+	+/- ¹	SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA detected and Flu B, Flu A RNA not detected ¹
-	+	+	-	+/- ¹	Flu B, Flu A RNA detected and SARS-CoV-2, RSV (A/B) RNA not detected ¹
-	+	-	+	+/- ¹	Flu B, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu A RNA not detected ¹
-	-	+	+	+/- ¹	Flu A, RSV (A/B) RNA detected and SARS-CoV-2, Flu B RNA not detected ¹
+	-	-	-	+/- ¹	SARS-CoV-2 RNA detected ¹
-	+	-	-	+/- ¹	Influenza B RNA detected ¹
-	-	+	-	+/- ¹	Influenza A RNA detected ¹
-	-	-	+	+/- ¹	RSV RNA detected ¹
-	-	-	-	+ ²	SARS-CoV-2, Flu B, Flu A and RSV (A/B) RNA not detected ²
-	-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

2 A sample is considered negative if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the endogenous internal control is positive (Ct less than 35). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control. In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay following the indications below.

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

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal swabs.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B), either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of the *N* and *ORF1ab* genes of SARS-CoV-2, *M1* gene of Influenza B, *M1* gene of Influenza A and *N* gene of RSV (types A and B) used in VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other respiratory microorganisms, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) strains.
 - Organism levels in the specimen below the limit of detection or cutoff for the assay.

- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19, gripe and RSV or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable virus and does not imply that these virus are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of target viral sequences.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- A negative result does not preclude the presence of target *RNA* in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A or RSV (A/B) infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample, or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (EIC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

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

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

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

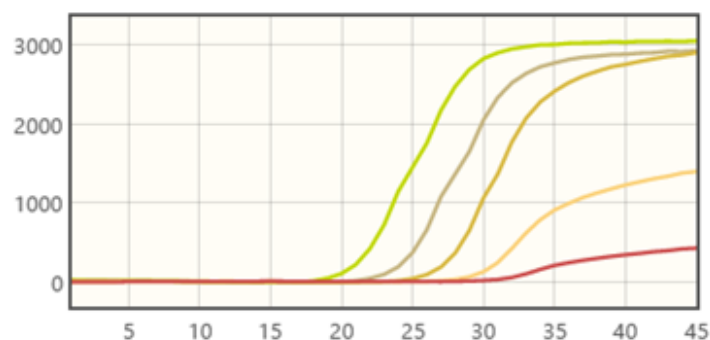


Figure 3. Dilution series of Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

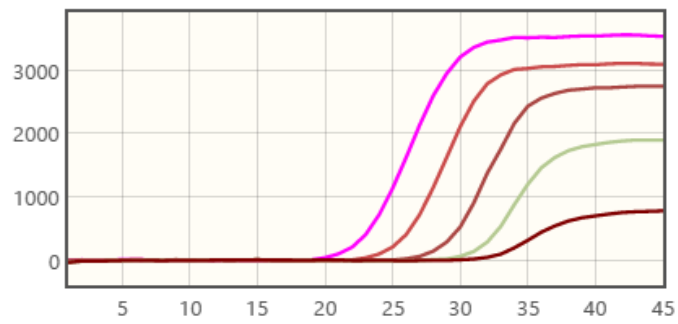


Figure 4. Dilution series of Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

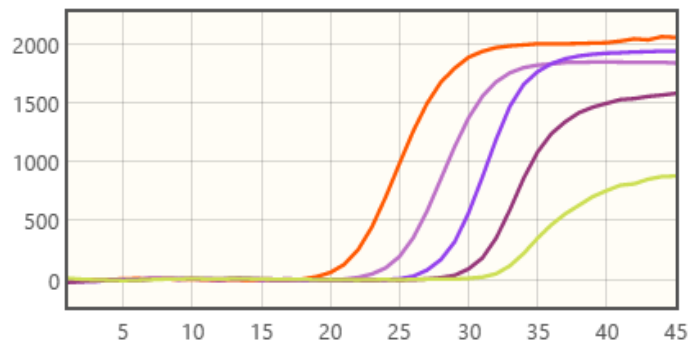


Figure 5. Dilution series of RSVA (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).

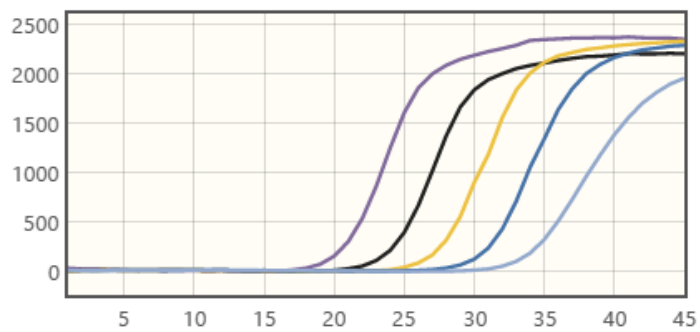
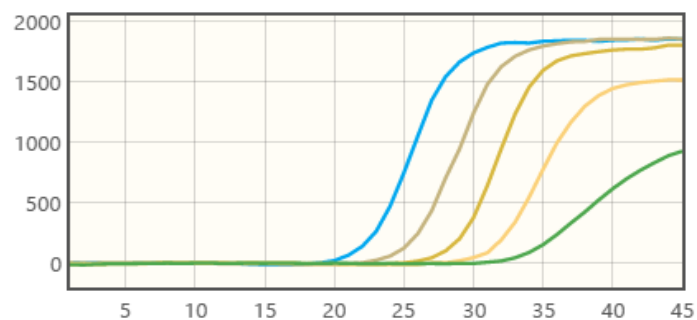


Figure 6. Dilution series of RSVB (5×10^5 - 5×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (CY5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Respiratory Virus Mix I* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

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

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

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

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

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

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

FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test RT-PCR automatisé en temps réel conçu pour la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2, de l'Influenza B, de l'Influenza A et du RSV (types A et B) dans les échantillons respiratoires (écouvillons nasopharyngés) de patients suspectés de présenter une infection respiratoire par leur prestataire de santé. Ce test est destiné à faciliter l'identification d'une infection par le SARS-CoV-2, l'Influenza B, l'Influenza A et le RSV (types A et B) en combinaison avec les signes et symptômes cliniques du patient et les facteurs de risque épidémiologiques. Il utilise le BD MAX™ System pour l'extraction automatisée de l'ARN, puis la méthode RT-PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés à des réactifs universels et consommables pour le BD MAX™ System. L'ARN est extrait des échantillons et l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé et amplifié par RT-PCR, puis détecté au moyen de sondes fluorescentes à colorant rapporteur spécifiques pour SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A et RSV (types A et B).

2. Résumé et explication

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Procédé

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est conçu pour la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2, de l'Influenza B, de l'Influenza A et du RSV (types A et B) dans les échantillons nasopharyngés. La détection se fait en une seule étape par RT-PCR en temps réel au cours de laquelle la transcription inverse et l'amplification ultérieure de la séquence cible spécifique se produisent dans le même tube

réactionnel. La cible ARN isolée est transcrite, générant de l'ADN complémentaire par transcriptase inverse, étape qui est suivie par l'amplification d'une zone conservée des gènes *N* et *ORF1ab* du SARS-CoV-2, du gène *M1* de l'Influenza B, du gène *M1* de l'Influenza A et du gène *N* du RSV (types A et B) au moyen d'amorces spécifiques et d'une sonde marquée d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est basé sur l'activité de l'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le BD MAX™ System.

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon, polymérase et transcriptase inverse) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne endogène pour surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase. Le test utilise un gène présent dans l'ADN humain comme contrôle interne endogène (EIC) (gène *RNase P* humain). Les gènes présents dans l'ADN humain sont impliqués dans la maintenance des cellules de base et, par conséquent, sont censés être présents dans toutes les cellules humaines nucléées et maintenir des niveaux d'expression relativement constants.

Cible	Canal	Gène
SARS-CoV-2	475/520	Gène <i>N</i> et <i>ORF1ab</i>
Influenza B	530/565	Gène <i>Matrix (M1)</i>
Influenza A	585/630	Gène <i>Matrix (M1)</i>
RSV (A/B)	630/665	Gène <i>N</i>
Contrôle interne endogène (EIC)	680/715	Gène <i>RNase P</i> humain

Tableau 10. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 2 ci-après.

Réactif/matériau	Description	Code-barres	Quantité
<i>Respiratory Virus Mix I</i> reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces-sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne endogène dans un format stabilisé	Opercule 1K	2 poches de 12 tubes transparents
Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule 11	1 poche de 24 tubes transparents

Tableau 11. Réactifs et matériaux fournis avec le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, réf. n° VS-SFR124 (444219).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement indispensables, mais non inclus dans le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR en temps réel : BD MAX™ System (réf. : 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (réf. :442828 ou 442827).
- BD MAX™ PCR Cartridges (réf. : 437519).
- Mélangeur Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Eau exempte de nucléase.
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

6. Conditions de transport et de stockage

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

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le BD MAX™ System ne sont pas contaminés. Assurez-vous de toujours éviter tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase

(DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, de fumer ou d'appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et tout matériau ayant été exposés à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux et/ou présentant un danger biologique, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, la manipulation et l'élimination des échantillons.
- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les VIASURE Real Time PCR Detection Kits ne font pas l'objet de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) dans la mesure où ils sont classés comme produits non dangereux pour la santé et l'environnement, dès lors qu'ils ne contiennent aucune substance et/ou composition correspondant aux critères de classification des dangers énoncés dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou dont la concentration est supérieure à la valeur établie dans ledit règlement à des fins de déclaration.
- Consultez le mode d'emploi du BD MAX™ System pour en savoir plus sur les avertissements, les précautions et les procédures à respecter.

8. Protocole de test

8.1. Prélèvement, stockage et transport des échantillons

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testé sur des écouvillons nasopharyngés recueillis dans le milieu de transport stérile Vircell® ou dans le milieu de transport et de conservation stérile pour virus (Biocomma®), et dans le milieu de transport universel, selon l'échantillon. Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

La collecte, le stockage et le transport des échantillons doivent être conformes aux conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 72 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 72 heures), nous recommandons une expédition à une température ≤ -20 °C. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons respiratoires doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons, Site web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), et 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. Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN

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

1. Pipettez 400-750 µl de l'échantillon nasopharyngé dans un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocole PCR

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

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE Respiratory Virus Mix / Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Remarque : Si vous avez déjà créé le test pour le VIASURE Respiratory Virus Mix / Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).

- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : c'est-à-dire, *VIASURE Respiratory Virus Mix I*.
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Type 5 ».
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX, dans ce cas sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 950 µl.
- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure et disposez de tubes « Snap-In » (à clipser) avec un opercule à code-barres, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes personnalisés) :
 - a. « Snap-In 2 Barcode » (Code-barres Snap-In 2) : 1K (relatif au *Respiratory Virus Mix I* reaction tube (tube réactionnel)).
 - b. « Snap-In 3 Barcode » (Code-barres Snap-In 3) : 11 (pour le Rehydration Buffer Tube).
 - c. « Snap-In 4 Barcode » (Code-barres Snap-In 4) : autre tube réactionnel (opercule différent) si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Dual Master Mix Concentré Lyophilisé MM avec Tampon de Réhydratation (Section 8.3.1)).
- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 3).
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX™, les « PCR Settings » (Réglages PCR) et les « Test Steps » (Étapes du test) doivent être effectués pour les Snaps (clips) positions 2 (vert) et 4 (bleu).

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

Tableau 12. « PCR settings » (Réglages PCR).

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

- 10) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 4) suivants :

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

Tableau 13. Paramètres « Spectral Cross Talk » (crosstalk spectraux).

11) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 5).

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

Tableau 14. Protocole PCR.

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

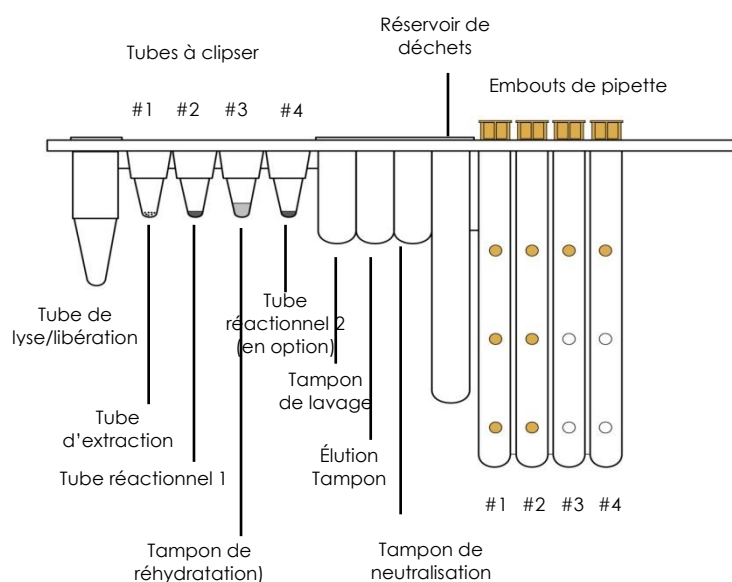
8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- 1) Prenez une barrette unitaire de réactifs (Unitized Reagent Strips) du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond des tubes et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du BD MAX™ System.
- 2) Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- 3) Déterminez et séparez le nombre approprié de tubes réactionnels de *Respiratory Virus Mix 1* reaction tube (opercule 1K) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir). voir figure 1).
 - a. Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - b. Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve intégralement au fond du tube.
 - i. Remarque : si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec

tampon de réhydratation) (section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels VIASURE supplémentaires (opercule différent) et clipsez-les dans les positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.

- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer Tubes (opercule 11) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
 - a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le tampon se trouve entièrement au fond du tube.

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



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System (logiciel v4.50A ou version supérieure).
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VIASURE Respiratory Virus Mix I (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification du Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) dans la fenêtre Sample Tube (tube d'échantillon) de la « Work List » (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la Work List (Liste de travail) et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les Sample Buffer Tubes soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les Sample Buffer Tubes sont correctement appariés.

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

8.3.4. Rapport BD MAX™

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

9. Interprétation des résultats

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

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

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 3). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification répondant aux critères définis n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 6.

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

Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :

SARS-CoV-2 (475/520)	Influenza B (530/565)	Influenza A (585/630)	RSV (A/B) (630/655)	Contrôle interne endogène (680/715)	Interprétation
+	+	+	+	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu B, Flu A et RSV (A/B) détectés ¹
-	+	+	+	+/- ¹	ARN du Flu B, Flu A, RSV (A/B) détectés et ARN du SARS-CoV-2 non détecté ¹
+	-	+	+	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu A, RSV (A/B) détectés et ARN du Flu B non détecté ¹
+	+	-	+	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu B, RSV (A/B) détectés et ARN du Flu A non détecté ¹
+	+	+	-	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu B, Flu A détectés et ARN du RSV (A/B) non détecté ¹
+	+	-	-	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu B détectés et ARN du Flu A, RSV (A/B) non détectés ¹
+	-	+	-	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, Flu A détectés et ARN du Flu B, RSV (A/B) non détectés ¹
+	-	-	+	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2, RSV (A/B) détectés et ARN du Flu B, Flu A non détectés ¹
-	+	+	-	+/- ¹	ARN du Flu B, Flu A RNA détectés et ARN du SARS-CoV-2, RSV (A/B) non détectés ¹
-	+	-	+	+/- ¹	ARN du Flu B, RSV (A/B) détectés et ARN du SARS-CoV-2, Flu A non détectés ¹
-	-	+	+	+/- ¹	ARN du Flu A, RSV (A/B) détectés et ARN du SARS-CoV-2, Flu B non détectés ¹
+	-	-	-	+/- ¹	ARN du SARS-CoV-2 détecté ¹
-	+	-	-	+/- ¹	ARN de l'Influenza B détecté ¹
-	-	+	-	+/- ¹	ARN de l'Influenza A détecté ¹
-	-	-	+	+/- ¹	ARN du RSV détecté ¹
-	-	-	-	+ ²	ARN du SARS-CoV-2, Flu B, Flu A et RSV (A/B) non détectés ²
-	-	-	-	- ²	Résultat non résolu (UNR) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu lors du traitement de l'échantillon et/ou des étapes d'amplification. ²
IND	IND	IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 15. Interprétation de l'échantillon.

+ : l'amplification a eu lieu.

- : l'amplification n'a pas eu lieu.

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

2 Un échantillon est jugé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection et si le contrôle interne endogène est positif (valeur Ct inférieure à 35). L'inhibition de la réaction polymérase peut être exclue

par l'amplification du contrôle interne. En cas de résultats non résolus (UNR), d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, il est recommandé de recommencer le test en suivant les indications ci-dessous.

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

REMARQUE : Les nouveaux échantillons peuvent être testés en même temps que les échantillons retestés.

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

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec des écouvillons nasopharyngés.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve intégralement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons respiratoires.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par le SARS-CoV-2, l'Influenza B, l'Influenza A ou le RSV (A/B), soit par des échantillons contenant de fortes concentrations de l'ARN cible, soit à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- La combinaison spécifique d'amorce et de sonde pour la détection des gènes *N* et *ORF1ab* du SARS-CoV-2, du gène *M1* de l'Influenza B, du gène *M1* de l'Influenza A et du gène *N* du RSV (types A et B) utilisée dans le VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ne présente pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine ou d'autres microorganismes respiratoires, susceptibles d'entraîner un résultat faux positif prévisible.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ARN).
 - La dégradation de l'ARN durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.

- Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de souches nouvelles ou inconnues du SARS-CoV-2, de l'influenza B, de l'influenza A ou du RSV (A/B).
- Les taux d'organismes dans l'échantillon inférieurs à la limite de détection ou à la valeur seuil pour le test.
- La présence d'inhibiteurs de qPCR ou d'autres types de substances interférentes. L'impact des vaccins, des thérapies antivirales, des antibiotiques, des chimiothérapies ou des médicaments immunosuppresseurs utilisés pour prévenir la COVID-19, la grippe ou le RSV ou utilisés pendant le traitement de l'infection n'a pas été évalué.
- Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Il est possible que certains échantillons ne présentent pas de courbes d'amplification du *RNase P* en raison du faible nombre de cellules humaines dans l'échantillon clinique d'origine. Un signal de contrôle interne négatif n'exclut pas la présence de l'ARN du SRAS-CoV-2, de l'Influenza B, de l'Influenza A et du RSV (A/B) dans un échantillon clinique.
- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de virus viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences virales cibles.
- Si les tests de diagnostic d'autres maladies respiratoires sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent une possibilité d'infection par le SARS-CoV-2, l'Influenza B, l'Influenza A ou le RSV (A/B), il convient alors d'envisager un résultat faux négatif et de discuter d'un nouveau test pour le patient.
- Un résultat négatif n'exclut pas la présence de l'ARN cible dans un échantillon clinique. Si les observations cliniques, les antécédents du patient et les informations épidémiologiques suggèrent une infection par le SARS-CoV-2, l'Influenza B, l'Influenza A ou le RSV (A/B), il convient d'envisager un nouveau test en augmentant le volume de l'échantillon.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne endogène (EIC) qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testée avec des échantillons cliniques respiratoires (écouvillons nasopharyngés) prélevés sur des patients

présentant une suspicion clinique d'infections respiratoires virales par SARS-CoV-2, Flu A/B et/ou RSV A/B. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
1	CerTest Biotec S.L. en collaboration avec la Biobank du système de Santé d'Aragón (Biobank of the Sistema de Salud de Aragón - BSSA) et les départements de Microbiologie et de Parasitologie du CHU des Asturies.	Écouvillons nasopharyngés	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
				Influenza B
				Influenza A
				RSV (A/B)

Tableau 16. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Les résultats vrais positifs et vrais négatifs, les résultats faux positifs et faux négatifs, la sensibilité et la spécificité pour le VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été calculées par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans le tableau suivant :

Site	Test comparateur	Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) ou VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, + étapes de séquençage du génome ultérieures	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 à utiliser sur le 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)

Tableau 17. Résultats TP (vrais positifs) et TN (vrais négatifs), résultats FP (faux positifs) et FN (faux négatifs), sensibilité, spécificité pour le VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Les résultats sont indicateurs d'une concordance pour la détection du SARS-CoV-2, Influenza B, Influenza A ou RSV (A/B) avec le VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System livre des résultats à la limite de détection (LoD, Limit of Detection) avec un taux de positivité $\geq 95\%$ comme suit :

- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) de 5,01 UI (unités internationales)/ μ l pour le SARS-CoV-2.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) de $1,8 \times 10^2$ CEID₅₀ (Dose infectieuse médiane sur embryon de poulet)/ml pour Influenza B.
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) de $10^{-0,5}$ TCID₅₀ (Dose infectieuse médiane en culture tissulaire) /ml pour Influenza A
- VIASURE Respiratory Virus Mix I Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) de 4 copies de génome/ μ l pour RSV A et RSV B.

Remarque : La limite de détection a été calculée en utilisant un volume d'échantillon de 400 μ L.

Des exemples de tracés d'amplification résultant de l'exécution d'un test sur le système BD MAX™ System sont présentés ci-dessous

Figure 2. Dilution en série du SARS-CoV-2 (5×10^5 - 5×10^0 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

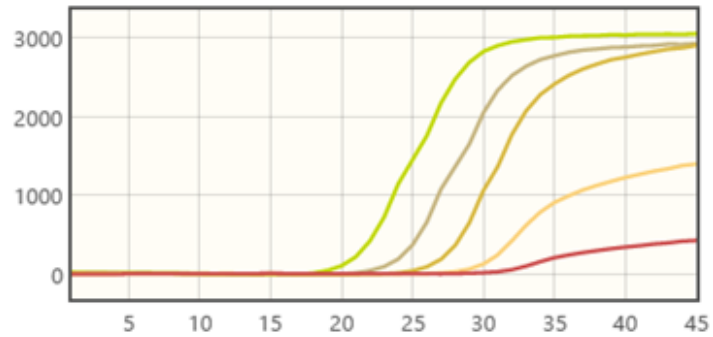


Figure 3. Dilution en série du Influenza B (5×10^5 - 5×10^0 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 530/565 [HEX]).

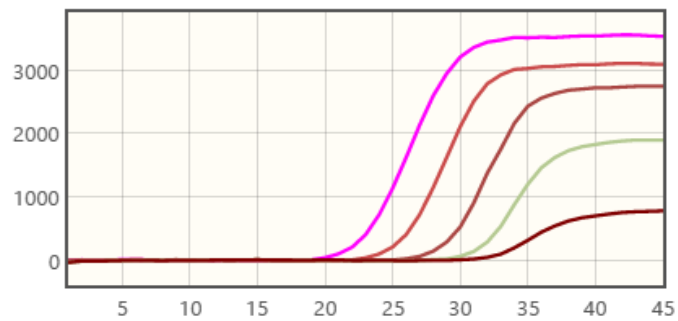


Figure 4. Dilution en série du Influenza A (5×10^5 - 5×10^0 copies par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 585/630 [ROX]).

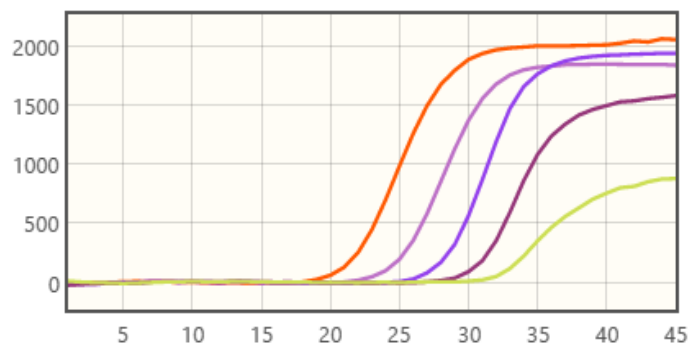


Figure 5. Dilution en série du RSVA (5×10^5 - 5×10^0 copies de génome par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [CY5]).

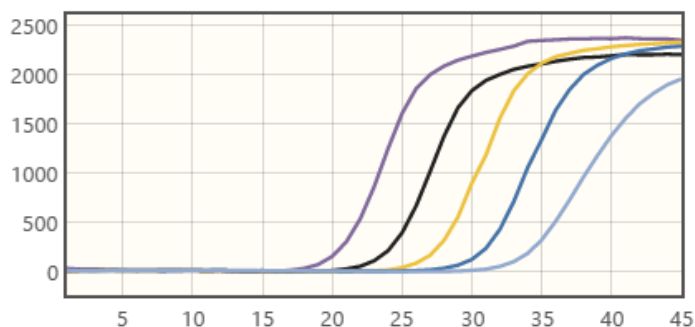
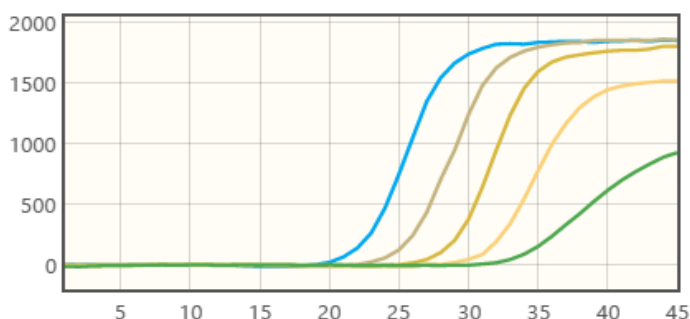


Figure 6. Dilution en série du RSVB (5×10^5 - 5×10^0 copies de génome par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [CY5]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test *Respiratory Virus Mix I* a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les agents pathogènes des voies respiratoires les plus courants. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants :

Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Entérovirus coxsackievirus A24, A9 et B3	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Entérovirus échovirus 30	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Entérovirus 68, 71	-	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
Bordetella holmesii	-	Haemophilus influenzae MinnA	-	Pneumocytis jirovecii type A1 et g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Legionella bozemanii	-	Rhinovirus humain	-
Bordetella pertussis	-	Legionella dumoffii	-	Souche coronavirus SARS Frankfurt 1	-
Chlamydia caviae	-	Legionella longbeachae	-	Staphylococcus aureus	-
Génotype Chlamydia psittaci A et C	-	Legionella micdadei	-	Staphylococcus epidermidis	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Legionella pneumophila	-	Streptococcus pneumoniae	-
Coronavirus humain 229E, OC43, NL63 et HKU1	-	Métapneumovirus humain A et B	-	Streptococcus pyogenes	-
Coronavirus MERS	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus salivarius	-

Tableau 18. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique

La réactivité de VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour **SARS-CoV-2** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait d'une souche humaine 2019-nCoV BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, 2019-nCoV 2019-nCoV/Italy-INMI1, ARN synthétique de contrôle pour le variant MT007544.1 (SARSCoV2 isolat Australia/VIC01/2020), variant MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolat Wuhan-Hu-1), Alpha variant (B.1.1.7 England/MILK-9E05B3/2020), Bêta variant (B.1.351 South Africa/KRISP-EC-K005299/2020), Gamma variant (P.1 Japan (Brazil) /IC-0564/2021) et Kappa variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021), et une souche inactivée par la chaleur SARSCoV-2 2019nCoV/USAWA1/2020 (ATCC® VR1986HK™), et un lysat de cellules irradiées de 2019-nCoV/USAWA1/2020, et des lysats de cellules lyophilisées de BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 et BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, et a présenté des résultats positifs.

La réactivité du VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour l'**influenza B** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait des souches virales suivantes : virus B/Phuket/3073/2013, virus B/Brisbane/60/2008, virus Influenza B/Florida/04/06, virus B/Pennsylvania/7/2007 (lignée Yamagata), virus B/Santiago/4364/2007 (lignée Yamagata), virus B/Brisbane/3/2007 (lignée Yamagata), virus B/Pennsylvania/5/2007 (lignée Victoria), virus B/Victoria/304/2006 (lignée Victoria), virus B/Bangladesh/3333/2007 (lignée Yamagata), et a présenté des résultats positifs.

La réactivité du VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour l'**influenza A** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait des souches virales suivantes : virus 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 et virus A/Cambodia/e0826360/2020 IVR-224, et a présenté des résultats positifs.











La réactivité du VIASURE *Respiratory Virus Mix I* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System pour le **RSV** a été évaluée par rapport à l'ARN extrait du Virus respiratoire syncytial A (souche A-2) et virus respiratoire syncytial B (souche 9320), et a présenté des résultats positifs.

Bibliography/ Bibliographie

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1>
4. Chen N. et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19>
7. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html>
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
12. Yan Y et al. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primerprobes.pdf>
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
18. McBride R. et al. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. et al. Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.

20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testingstrategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>
21. G. Neumann et al. Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
22. Y. Yang et al. Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
23. R.L. Kuo et al. Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
24. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available from: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/
25. S. Subhash Bawage et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
26. French, et al. Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
27. X. Yu et al. Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
28. N. Mazur et al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.
29. F. de-Paris et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
30. A. Hu et al. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
31. M. Hindiyeh et al. Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424.

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

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Conserver dans un endroit sec</p>	 <p>Use by Utiliser avant</p>	 <p>Manufacturer Fabricant</p>	 <p>Batch code (Lot) Numéro de lot</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les consignes d'utilisation</p>	 <p>Temperature limitation Consulter les consignes d'utilisation</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)</p>	 <p>Unique Device Identification Identification unique du dispositif</p>	 <p>Catalognumber Numéro de catalogue</p>

Trademarks

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

Change Control / Contrôle des modifications		
Version No. / Version n°	Changes / Modifications	Date / Date
00	Original version / Version originale.	25/07/2022
01	"Spectral Cross Talk" values of table 4 have been updated / Les valeurs de "Cross Talk spectral" du tableau 4 ont été mises à jour	02/08/2022

Table A 2. Control change table/ Tableau de changement de contrôle.

Revision: 02nd August 2022.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev02