

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

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

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

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

BD REF 444217

to be used with the BD MAX™ System
para ser utilizado con el sistema BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection and differentiation of RNA from the SARS-CoV-2, Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) and/or Human Respiratory Syncytial Virus A/B (RSV) in respiratory samples from individuals suspected of COVID-19 or other respiratory infection by their healthcare provider. This test is intended to be used as an aid in the identification of the presence of the SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV viral RNA. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from respiratory specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2, Flu A, Flu B and/or RSV.

2. Summary and Explanation

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

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

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

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) specimens collected mainly by a healthcare provider) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or



bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses, such as Influenza and RSV.

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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



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

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

4. Reagents provided

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

Reference	Reagent/Material	Description	Color/Barcode	Amount
VS-ABR212R	Flu A, Flu B & RSV reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Red or 1A foil	2 pouches of 12 tubes
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Transparent Green or 1G foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange or 11 foil	1 pouch of 24 tubes

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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



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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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



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

8. Procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

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

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

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

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

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

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

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

8.3. PCR PROTOCOL

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



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

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

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

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

Table 2. PCR settings.

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

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



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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 4. PCR protocol.

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

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

Table 5. PCR settings.

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

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



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

Table 6. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 7. PCR protocol.

16) Click the “Save Test” button.

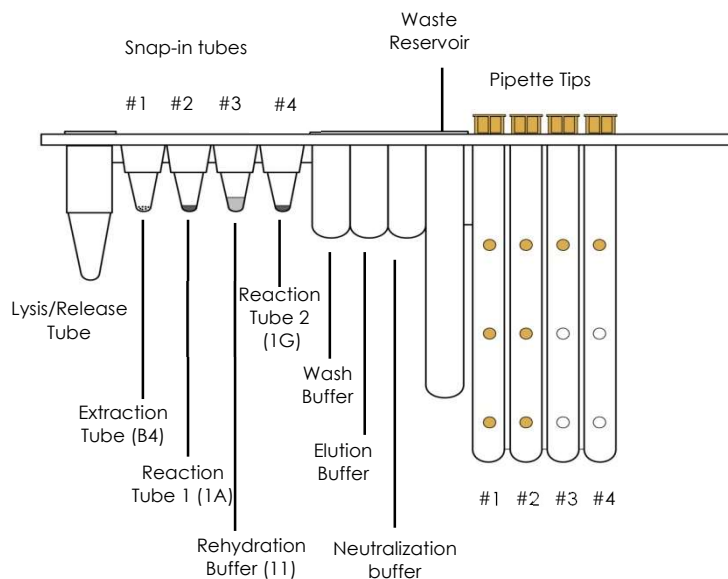
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

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



- 5) Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 ($N1 + N2$) reaction tubes (green or 1G foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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



8.3.4 BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

Results should be read and analyzed using the following tables:

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

Flu A (475/520)	Flu B (585/630)	RSV (630/665)	Internal control (530/565)	Interpretation
+	+	+	+/-1	Flu A, Flu B and RSV RNA Detected ¹
+	-	-	+/-1	Flu A RNA Detected, Flu B and RSV RNA Not Detected ¹
+	+	-	+/-1	Flu A and Flu B RNA Detected, and RSV RNA Not Detected ¹
+	-	+	+/-1	Flu A and RSV RNA Detected, and Flu B RNA Not Detected ¹
-	+	-	+/-1	Flu B RNA Detected, Flu A and RSV RNA Not Detected ¹
-	+	+	+/-1	Flu B and RSV RNA Detected, Flu A RNA Not Detected ¹
-	-	+	+/-1	RSV RNA Detected, Flu A and Flu B RNA Not Detected ¹
-	-	-	+2	Flu A, Flu B and RSV 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	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

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

+: Amplification occurred
-: No amplification occurred



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

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

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

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

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

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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

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

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

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



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

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

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

10. Limitations of the test

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



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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

The results were as follows:



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

Table 10. Comparative results for Flu A.

Positive percent agreement is >96% and negative percent agreement is >99%.

**The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.*

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

Table 11. Comparative results for Flu B.

Positive percent agreement is >99% and negative percent agreement is >98%.

**The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.*

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

Table 12. Comparative results for RSV.

Positive percent agreement is >88% and negative percent agreement is >99%.

**The low amount of template RNA in this respiratory sample is below the detection limit of the method used.*

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



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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

Figure 2. Dilution series of Flu A (2*10⁶-2*10¹ copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

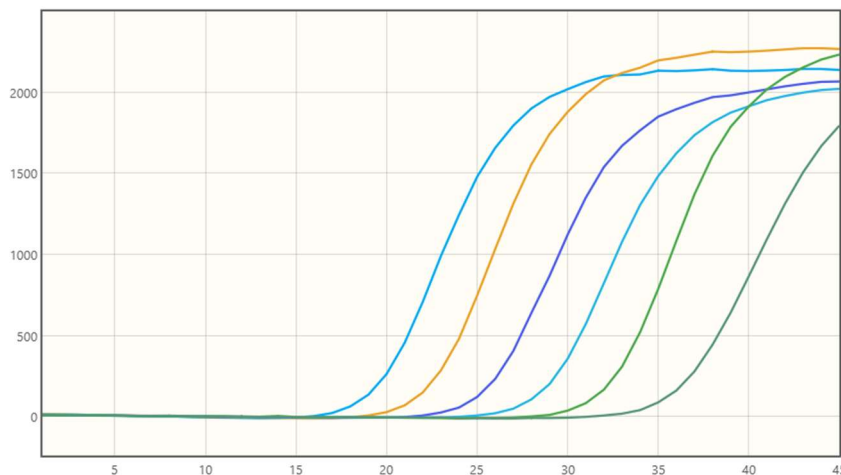


Figure 3. Dilution series of Flu B (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).

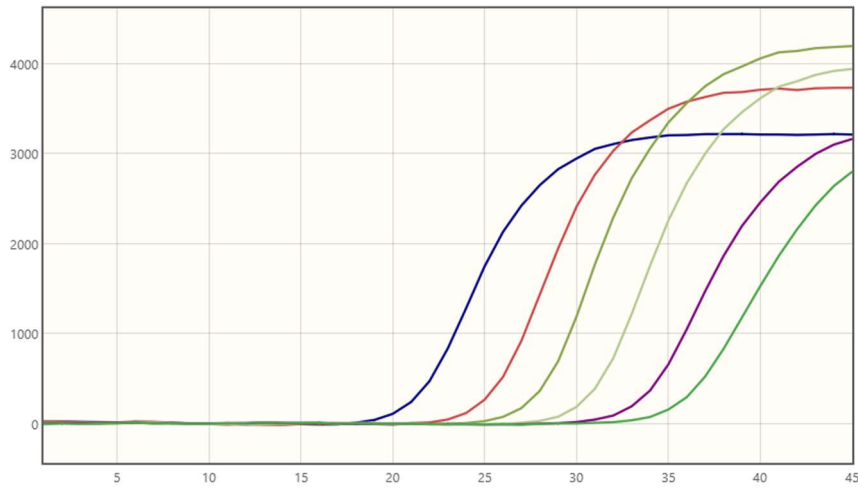


Figure 4. Dilution series of RSV (2×10^6 - 2×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).

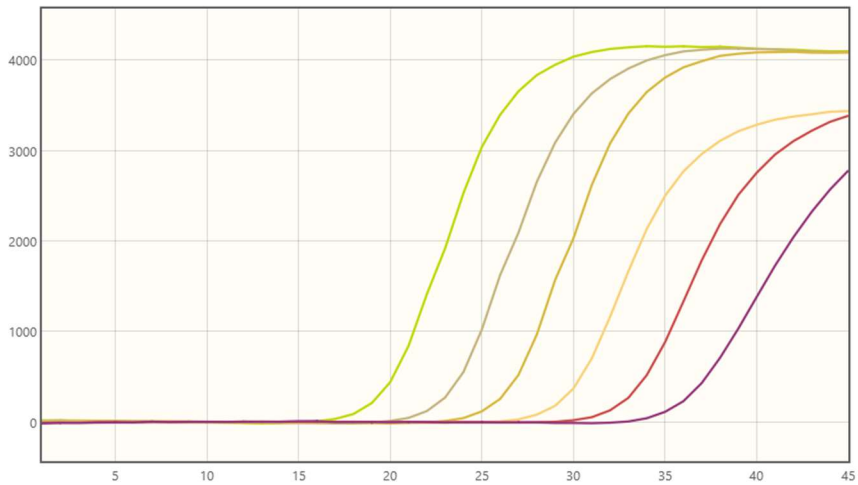


Figure 5. Dilution series of SARS-CoV-2 ($N1 + N2$) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

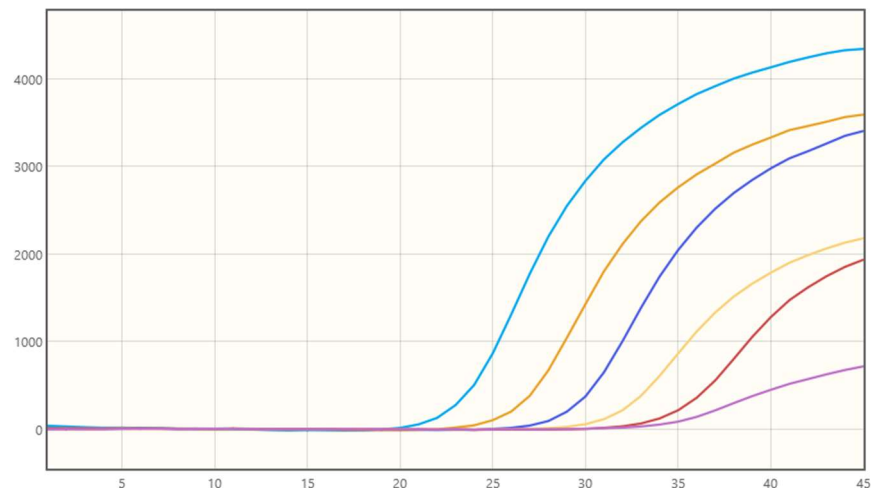
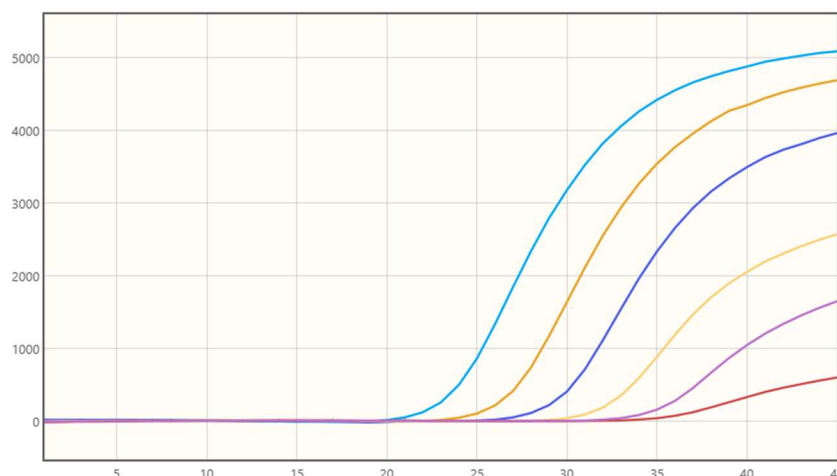


Figure 6. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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



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



Cross-reactivity testing					
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IBDCDCRG30 virus	- /+	<i>Legionella micdadei</i>	-
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus	- /+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus	- /+	Human metapneumovirus A and B	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus	- /+	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus	- /+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus	- /+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus	- /+	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus	- /+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus	- /+	Human rhinovirus type C	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4) virus	- /+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	- /+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus	- /+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus	- /+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	- /+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus	- /+	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B (strain CH93(18)-18)	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	- /+	Human Respiratory Syncytial Virus strain Long	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus	- /+		

Table 14. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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



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

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



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

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

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



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System es una prueba de RT-PCR en tiempo real automatizada diseñada para la detección y diferenciación cualitativa de RNA de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y/o Virus Respiratorio Sincitial humano A/B (RSV) en muestras respiratorias procedentes de individuos con sospecha de COVID-19 u otra infección respiratoria por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar la identificación de la presencia de RNA viral de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y/o RSV. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción automatizada del RNA y posterior RT-PCR a tiempo real utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El RNA es extraído a partir de los especímenes respiratorios, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y RSV.

2. Introducción y explicación

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

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

Se ha confirmado la transmisión de persona a persona del SARS-CoV-2, incluso durante el período de incubación en asintomáticos, y el virus puede causar enfermedad respiratoria severa como la producida por el SARS-CoV. Aunque la neumonía es la principal enfermedad asociada, algunos pacientes han desarrollado neumonía severa, edema pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda o fallo multiorgánico y muerte. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (*Centers of Disease Control and Prevention, CDC*) creen que los síntomas del SARS-CoV-2 pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 tras la exposición, siendo los más comunes fiebre o escalofríos, tos, fatiga, anorexia, mialgia y disnea. Aquellos síntomas menos comunes son dolor de garganta, congestión nasal, dolor de cabeza, diarrea, náuseas y vómitos. También se ha descrito pérdida del olfato (anosmia) o pérdida del gusto (ageusia) antes del inicio de los síntomas respiratorios. Los adultos mayores y las personas con afecciones médicas subyacentes graves, como enfermedad cardíaca o pulmonar o diabetes, parecen tener un mayor riesgo de desarrollar complicaciones más graves de la enfermedad COVID-19.



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

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

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

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

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

3. Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System está diseñado para la identificación de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y/o RSV en muestras respiratorias. La detección se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo tubo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y RSV se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando



oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con dos regiones diana (N1 y N2) conservada del gen *N* para SARS-CoV-2, una región diana conservada del gen *M1* para Influenza A e Influenza B y del gen *N* para RSV.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System está compuesto de dos tubos de reacción distintos. Uno de ellos detecta y diferencia el RNA de Influenza A, Influenza B y/o RSV (transparente sellado rojo o sellado 1A) y el otro detecta específicamente RNA de SARS-CoV-2 (transparente sellado verde o sellado 1G). Cada tubo contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno (endógeno en el tubo de reacción de SARS-CoV-2) para controlar el proceso de extracción y/o la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo de SARS-CoV-2 utiliza un gen humano housekeeping como control interno endógeno (gen *RNase P* presente en el DNA humano). Los genes humanos housekeeping están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes. Cada región diana RNA se amplifica y se detecta en los canales específicos (475/520, 585/630, y/o 630/665) y el control interno (CI) en el canal 530/565. En el ensayo de Influenza A, Influenza B y/o RSV, la región diana RNA de Influenza A se amplifica y detecta en el canal 475/520, la región diana RNA de Influenza B en el canal 585/630, la región diana RNA de RSV en el canal 630/665 y el control interno (CI) de este ensayo en el canal 530/565. En el ensayo de SARS-CoV-2, la región diana N2 se amplifica y detecta en el canal 475/520, la región diana N1 en el canal 630/665 y el control interno endógeno (CI) en el canal 530/565.

4. Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color/Código de barras	Cantidad
VS-ABR212R	<i>Flu A, Flu B & RSV</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente Sellado Rojo o Sellado 1A	2 sobres de 12 tubos
VS-NCO312	<i>SARS-CoV-2 (N1 +N2)</i> reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno endógeno en formato estabilizado	Transparente Sellado Verde o Sellado 1G	2 sobres de 12 tubos
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Transparente Sellado Naranja o Sellado 1I	1 sobre de 24 tubos

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con Cat. N°.VS-FNR124 (444217).



5. Reactivos y equipos requeridos y no suministrados

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

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

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Proteger y conservar los componentes alejados de la luz.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación



microbiológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (*cartridges*).

- Asegúrese de usar un tubo para determinar el RNA de Influenza A, Influenza B y RSV en Snap-In 2 (posición verde) y otro tubo para determinar el RNA de SARS-CoV-2 en Snap-In 4 (posición azul). Tenga cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.
- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales

8. Procedimiento del test

8.1. RECOLECCIÓN, ALMACENAJE Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ha sido validado en frotis nasofaríngeos/orofaríngeos recolectados en medio de transporte viral (VTM) (Vircell S.L., España).

Otros tipos de muestras a los hisopos nasofaríngeo/ orofaríngeo en VTM deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados entre 2-8°C hasta 48 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 48 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 48 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.



8.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE RNA

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

1. Pipetear 400 µL de hisopo nasofaríngeo/orofaríngeo recolectado en medio de transporte viral (VTM) en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón con el tapón perforable. Asegurar que se mezcla completamente vorteadando la muestra 1 minuto a alta velocidad. Proceder con BD MAX™ System Operation.

Nota: *Flu A, Flu B & RSV* reaction tube ha sido validado con un volumen de muestra de 200-400 µL y *SARS-CoV-2 (N1 + N2)* reaction tube con un volumen de muestra de 400-750 µL.

8.3. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BD MAX™

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

8.3.1. Programación de la prueba VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor".
- 2) Hacer click en el botón "Create".
- 3) En la pantalla de Información básica, en la ventana "Test Name", escribir el nombre del test: ej. VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV (VSARSCoV2,FluA+B,RSV).
- 4) En el menu desplegable "Extraction Type", seleccionar "ExK TNA-3".
- 5) En el menu desplegable "Master Mix Format", elegir "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) En "Sample extraction parameters" seleccionar "User defined" y ajustar el volumen de la muestra a 950 µL.
- 7) En "Ct Calculation" seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior y se tienen tubos con sellado con código de barras, en "Custom Barcodes" seleccionar la siguiente configuración:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1A (en relación a *Flu A, Flu B & RSV* reaction tube)
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (en relación a Rehydration Buffer tube)
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G (en relación a *SARS-CoV-2 (N1 + N2)* reaction tube)



- 9) "PCR Settings" y "Test Steps" deben ser completados para la posición Snap-In 2 (verde) y la posición Snap-In 4 (azul).
- 10) Snap-In 2 (verde). En la pestaña "PCR settings" introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings", "Gains" y "Threshold" (Tabla 2).

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

Tabla 2. PCR settings.

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

- 11) Snap-In 2 (verde). En la pestaña "PCR settings" introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Tabla 3)

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

Table 3. Parámetros "Spectral cross-talk".

- 12) Snap-In 2 (verde). En la pestaña "Test Steps", introducir el protocolo de PCR (Tabla 4).

Etapas	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	✓

Tabla 4. Protocolo PCR.

- 13) Snap-In 4 (azul). En la pestaña "PCR settings" introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings", "Gains" y "Threshold" (Tabla 5).



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

Tabla 5. PCR settings.

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

- 14) Snap-In 4 (azul). En la pestaña "PCR settings" introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Tabla 6).

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

Tabla 6. Parámetros "Spectral cross-talk".

- 15) Snap-In 4 (azul). En la pestaña "Test Steps", introducir el protocolo de PCR (Tabla 7).

Step Name (Etapa)	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	✓

Tabla 7. Protocolo PCR.

- 16) Hacer click en el botón "Save Test".

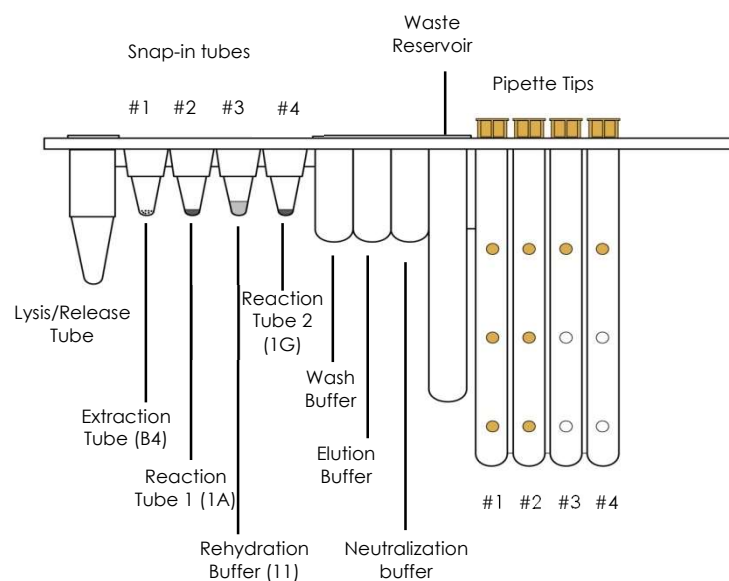
8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción (BD MAX™ ExK TNA-3 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protector. Colocar el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de



- color blanco en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- 3) Calcular y separar el número adecuado de VIASURE *Flu A*, *Flu B* & *RSV reaction tube* (sello rojo o sello 1A) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
 - 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello naranja o sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
 - a. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
 - 5) Calcular y separar el número adecuado de VIASURE SARS-CoV-2 ($N1 + N2$) reaction tube (sello verde o sello 1G) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

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



8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" en la pantalla "Run" utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test", seleccionar VSARSCoV2,FluA+B,RSV (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del tubo de tampón de muestra BD MAX™ ExK TNA-3 en la ventana de "Sample tube" dentro de la pestaña "Work list", ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir la identificación de la muestra/paciente y/o "Accession" en la pestaña "Work list" y haga clic en el botón "Save". Continúe hasta que se introduzcan todos los Sample Buffer Tubes. Asegúrese de que la identificación la muestra/paciente y los Sample Buffer Tubes estén correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" para comenzar con el procedimiento.

8.3.4 Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results".
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view".
- 3) Hacer click en el botón "Print", seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" de la pantalla "Run Report".

9. Interpretación de los resultados

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

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

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 2). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en las Tablas 8 y 9.



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

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando las siguientes tablas:

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

Influenza A (475/520)	Influenza B (585/630)	RSV (630/665)	Control Interno (530/565)	Interpretación
+	+	+	+/- ¹	Influenza A, Influenza B y RSV RNA Detectado ¹
+	-	-	+/- ¹	Influenza A RNA Detectado, Influenza B y RSV RNA No Detectado ¹
+	+	-	+/- ¹	Influenza A e Influenza B RNA Detectado, y RSV RNA No Detectado ¹
+	-	+	+/- ¹	Influenza A y RSV RNA Detectado, e Influenza B RNA No Detectado ¹
-	+	-	+/- ¹	Influenza B RNA Detectado, Influenza A y RSV RNA No Detectado ¹
-	+	+	+/- ¹	Influenza B y RSV RNA Detectado, Influenza A RNA No Detectado ¹
-	-	+	+/- ¹	RSV RNA Detectado, Influenza A e Influenza B RNA No Detectado ¹
-	-	-	+ ²	Influenza A, Influenza B y RSV RNA No Detectado ²
-	-	-	- ²	Resultado no resuelto (UNR): debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación ²
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND). Debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 8. Interpretación *Flu A, Flu B & RSV reaction tube*

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

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

2 Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta (Ct menor de 40). La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno. En caso de ausencia de la señal de control interno en muestras negativas (Resultado no resuelto-UNR), se recomienda repetir el ensayo.



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

SARS-CoV-2 (diana N2) (475/520)	Control Interno Endógeno (530/565)	SARS-CoV-2 (diana N1) (630/665)	Interpretación
+	+/- ³	+	SARS-CoV-2 gen N RNA Detectado ³
+ ⁴	+/- ³	-	SARS-CoV-2 gen N RNA Detectado ^{3,4}
-	+/- ³	+ ⁴	SARS-CoV-2 gen N RNA Detectado ^{3,4}
-	+ ⁵	-	SARS-CoV-2 gen N RNA No Detectado ⁵
-	- ⁵	-	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación ⁵
IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 9. Interpretación SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

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

4 Si únicamente amplifica una diana del gen N, verifique la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. En caso de una interpretación dudosa, dependiendo del material disponible, también se recomienda:

- volver a extraer y volver a probar otra alícuota de la misma muestra (si es posible, incrementando el volumen de muestra a 750 µl) u,
- obtener un nuevo espécimen y volver a testar.

5 En el caso de que las regiones diana de SARS-CoV-2 resulten negativas, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el Control interno endógeno es un gen human *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo.

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

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



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con hisopos nasofaríngeos/orofaríngeos en VTM.
- Para tener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras respiratorias.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y/o RSV ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de las regiones conservadas del gen *N* (SARS-CoV-2) empleadas en el test VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System fueron diseñadas en base al ensayo del CDC de EE.UU. para la detección específica de SARS-CoV-2 amplificando dos regiones únicas del gen *N*. Éstas no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana, SARS-CoV u otros coronavirus, que pudiera originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de RNA).
 - Degradación del RNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de SARS-CoV-2, Influenza y/o RSV.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- En SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) reaction tube, una amplificación de una única diana o incluso resultados positivos aleatorios sugieren un rendimiento de amplificación ligeramente diferente de las regiones diana del gen *N*. Las muestras con baja carga viral pueden dar como resultado la amplificación de una única diana del gen *N*. En caso de duda, se recomienda consultar un laboratorio de referencia para realizar más pruebas.



- Algunas muestras (en SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube) pueden no presentar curvas de amplificación de RNasa P debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original. Una señal del CI negativa no impide la presencia de RNA del SARS-CoV-2, Influenza y /o RSV en una muestra clínica.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias virales diana.
- Resultados negativos no excluyen padecer la infección por SARS-CoV-2, Influenza y/o RSV y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por el SARS-CoV-2 y la nueva cepa Influenza A. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el virus.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por SARS-CoV-2, Influenza y/o RSV, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- En el caso de obtener con VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System resultados no resueltos, indeterminados o incompletos se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

11. Control de calidad

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un control interno en cada Flu A, Flu B & RSV reaction tube y un control interno endógeno en cada SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

La funcionalidad clínica de VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System fue testada individualmente en cada tubo de reacción.

La funcionalidad clínica de VIASURE Flu A, Flu B & RSV reaction tube se evaluó usando 344 muestras respiratorias (frotis orofaríngeos) de pacientes sintomáticos. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (cobas® Influenza A/B & RSV (Roche)).

Los resultados fueron los siguientes:



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

Table 10. Comparativa de resultados para Influenza A.

El porcentaje de concordancia positivo es >96% y el porcentaje de concordancia negativo es >99%.

* La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

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

Table 11. Comparativa de resultados para Influenza B.

El porcentaje de concordancia positivo es >99% y el porcentaje de concordancia negativo es >98%.

* La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

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

Table 12. Comparativa de resultados para RSV.

El porcentaje de concordancia positivo es >88% y el porcentaje de concordancia negativo es >99%.

* La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

La funcionalidad clínica de VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube se evaluó utilizando 254 muestras respiratorias (frotis nasofaríngeos recogidos en medio de transporte Vircell) de pacientes con sospecha clínica de COVID-19 u otras enfermedades respiratorias similares. Estos resultados se compararon con los obtenidos con el



diagnóstico clínico realizado con el ensayo Simplexa™ COVID-19 Direct assay y con el análisis de las discrepantes con el protocolo Charité.

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

Tabla 13. Comparativa de resultados para SARS-CoV-2.

*El diagnóstico inicial de una de las dos muestras fue inválido y fue reportado al paciente como positivo para el período de prevención y cuarentena.

SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube detectó dos muestras positivas que no fueron detectadas usando Simplexa™ COVID-19 Direct assay y el protocolo Charité.

Los valores de porcentaje de concordancia positivo (PPA) y porcentaje de concordancia negativo (NPA) para SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube son de >99% y 98%, respectivamente.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar virus SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B y/o RSV utilizando VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tiene un límite de detección de ≥10 copias genómicas por reacción para Influenza A, ≥20 copias genómicas por reacción para Influenza B, ≥5 copias genómicas por reacción para RSV y ≥5 copias genómicas por reacción para SARS-CoV-2 (Figuras 2, 3, 4, 5 y 6) con una tasa positiva ≥ 95%.

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de Influenza A (2*10⁶-2*10¹ copias por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

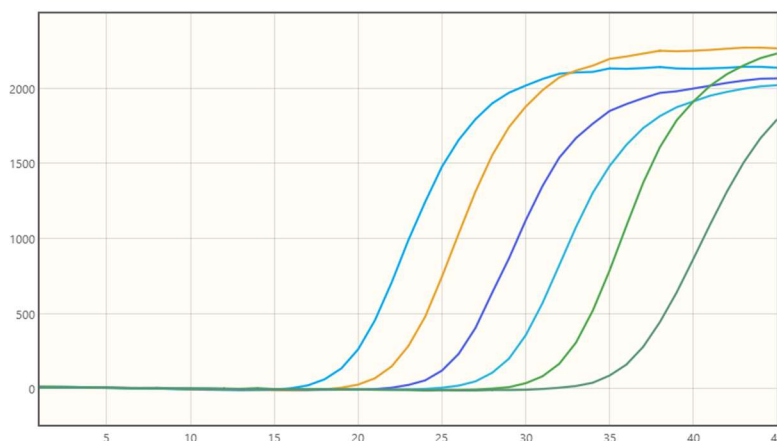


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de Influenza B ($2 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^1$ copias por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).

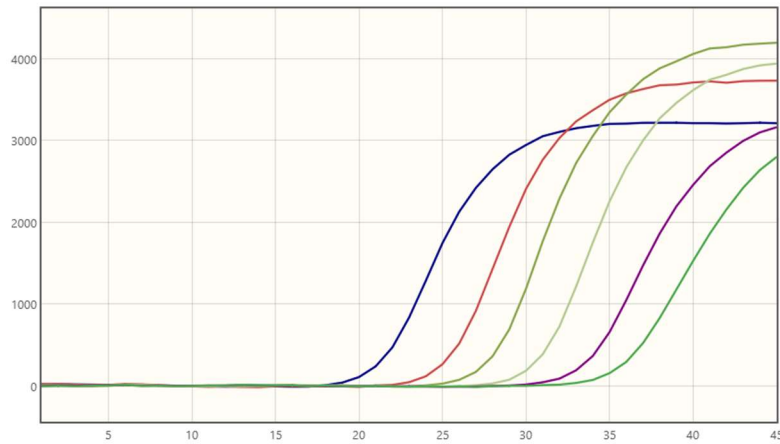


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de RSV ($2 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^1$ copias por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).

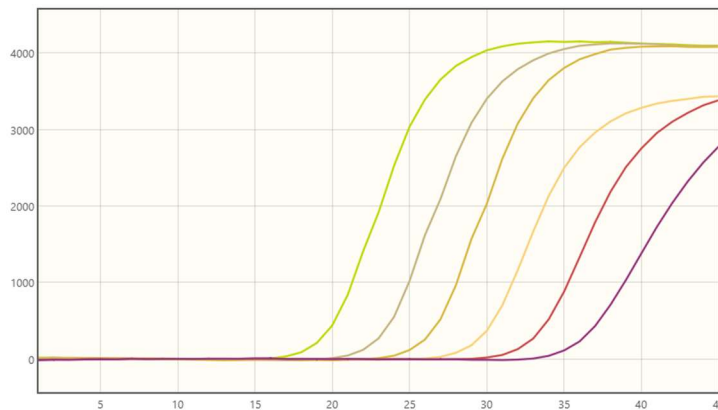


Figura 5. Diluciones seriadas de SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9.9 \cdot 10^4$ - $9.9 \cdot 10^0$ y $5.0 \cdot 10^0$ copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

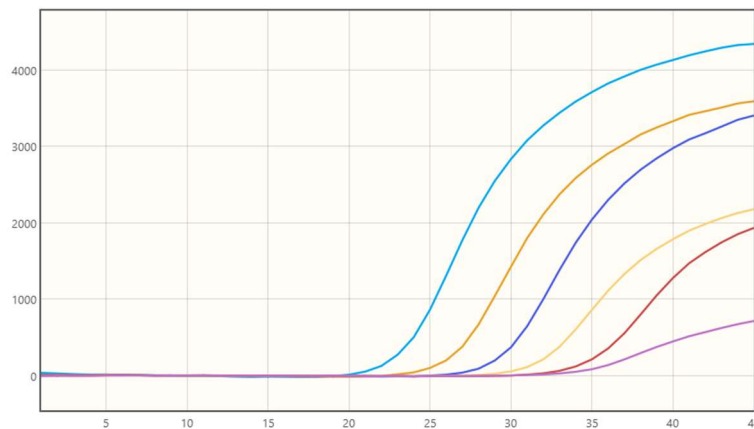
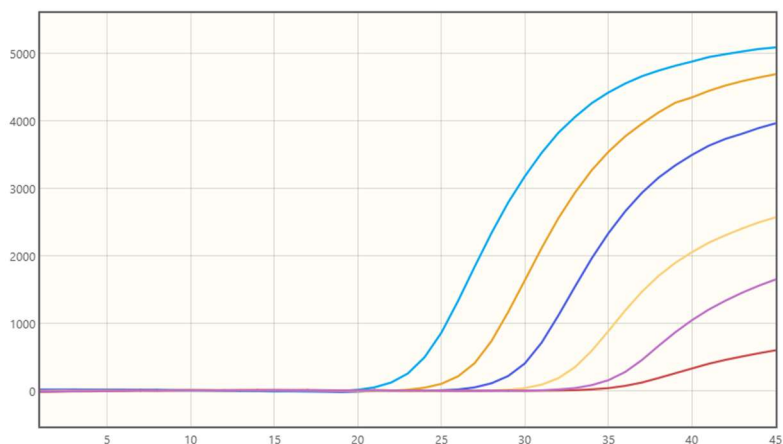


Figura 6. Diluciones seriadas de SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9*10⁴-9.9*10⁰ y 5.0*10⁰ copias genómicas por reacción). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

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



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



Prueba de reactividad cruzada					
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IBDCDCRG30 virus	- /+	<i>Legionella micdadei</i>	-
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBDCDC-RG7 (H5N1) virus	- /+	<i>Legionella pneumophila</i>	-
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus	-/+	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus	- /+	Human metapneumovirus A and B	-
Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus	- /+	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus	- /+	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBDCDC-RG (H5N1) virus	- /+	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus	- /+	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus	-/+	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBDCDC-4 virus	- /+	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus	- /+	Human rhinovirus type C	-
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4) virus	- /+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2013 (H5N8) virus	- /+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus	- /+	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBDCDC-5 (H7N2) virus	- /+	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus	- /+	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus	-/+	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBDCDC-1 virus	- /+	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B (strain CH93(18)-18)	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	- /+	Human Respiratory Syncytial Virus strain Long	-/+
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus	-/+	Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus	- /+		

Tabla 14. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **SARS-CoV-2** se evaluó frente a las cepas de RNA de 2019-nCoV humano BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, los controles de RNA



sintéticos de 2 variantes del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) y MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza A** se evaluó frente a RNA extraído a partir de las cepas: Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) virus (Clade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus, Influenza A/Turkey/Germany/R2485-86/2014 (H5N8) virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IB CDC-1 virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus, Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus, mostrando un resultado positivo.



La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **Influenza B** se evaluó frente a RNA extraído a partir de las cepas: Influenza B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Colorado/6/2017 virus, Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus, Influenza B/Maryland/15/2016 virus, Influenza B/Netherlands/207/06 virus, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, Influenza B/Nevada/3/2011 virus, Influenza B/New Jersey/1/2012 virus, Influenza B/Texas/02/2013 virus, Influenza B/Townsville/8/2016 virus (**B/linaje Victoria**); Influenza B/Canberra/11/2016 virus, Influenza B/Florida/4/2006 virus, Influenza B/Florida/07/2004 virus, Influenza B/Guangdong/120/2000 virus, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) virus, Influenza B/Jiangsu/10/2003 virus, Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus, Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus, Influenza B/Phuket/3073/2013 virus, Influenza B/Texas/06/2011 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus (**B/linaje Yamagata**), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2, Flu (A+B) & RSV Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System para **RSV** se evaluó frente a RNA extraído a partir de RSV A y B (cepa CH93(18)-18) y Virus Respiratorio Sincitial cepa Long, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed September 2020.
4. Chen N. *et al.* Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed September 2020.
7. Lu R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed September 2020.
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed September 2020.













11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed September 2020.
12. Yan Y *et al.* Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed September 2020.
14. Chu D.K.W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed September 2020.
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
18. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. *et al.* Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.
20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance> Accessed September 2020.
21. G. Neumann *et al.* Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
22. Y. Yang *et al.* Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
23. R.L. Kuo *et al.* Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
24. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available from: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/ . Accessed September 2020.
25. S. Subhash Bawage *et al.* Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Advances in Virology* 2013.
26. French, *et al.* Risk of nosocomial respiratory syncytial virus infection and effectiveness of control measures to prevent transmission events: a systematic review. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2016.
27. X. Yu *et al.* Human respiratory syncytial virus in children with lower respiratory tract infections or influenza-like illness and its co-infection characteristics with viruses and atypical bacteria in Hangzhou, China. *Journal of Clinical Virology* 2015; 69:1-6.
28. N. Mazur *et al.* Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015; 3: 888-900.



29. F. de-Paris *et al.* Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189-192.
30. A. Hu *et al.* Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(1): 149-154.
31. M. Hindiyeh *et al.* Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p>In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code (Lot) Número de lote</p>
 <p>Consult Instructions for Use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalognumber Número de referencia</p>

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







CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE



IVD

Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC