

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/

Håndbog for følgende referencer:

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

til brug sammen med BD MAX™-systemet



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in respiratory samples from patients with signs and symptoms of COVID-19 infection. This test is intended to be used as an aid in the identification in the diagnosis of COVID-19 in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA from respiratory specimens is detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2.

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to *Coronaviridae* family [1,2]. There are six coronavirus species known to cause human diseases [2]. 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 [2]. 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 [1,3].

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 [2,4]. 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 [5].

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 [1,6,7]. 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 [1,4]. 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, cough, myalgia and dyspnea [1,4,8]. Less common symptoms are sore throat, headache, diarrhea and vomiting [1,4]. It seems that older males with comorbidities have been more affected [4].

Diagnosis of SARS-CoV-2 is performed detecting conventional causes of pneumonia early and detected by next-generation sequencing or real-time RT-PCR methods [1,9]. Several assays that detect the SARS-CoV-2 have been are currently available, and listed on the WHO (World Health Organization) website <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage) for the identification of SARS-



CoV-2 [9,11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [9,11].

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification of SARS-CoV-2 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 well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of *S* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit 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 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains in each tube all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. SARS-CoV-2 is amplified and detected in channel 475/520 and the internal control (IC) in in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Green foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-NCO124 (444212).

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 *S* gene Real Time PCR Detection kit.

- 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, they can be used for 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 *S* gene Real Time PCR Detection kit, 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.
- 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. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit has been validated on negative nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) (Viracell S.L., Spain) and nucleic acid isolated from positive nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.

Another different 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 the 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 between 200 and 750 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.

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 *S* gene Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene 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 "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 500 µL.
 - a. Example: If pipette 200 µL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 700 µL.
 - b. Note: maximum setting is 950 µL
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
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.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

		False Receiving 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	-	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 3. Spectral cross-talk parameters.



- 10) 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	-
			58	60°C	✓

Table 4. PCR protocol.

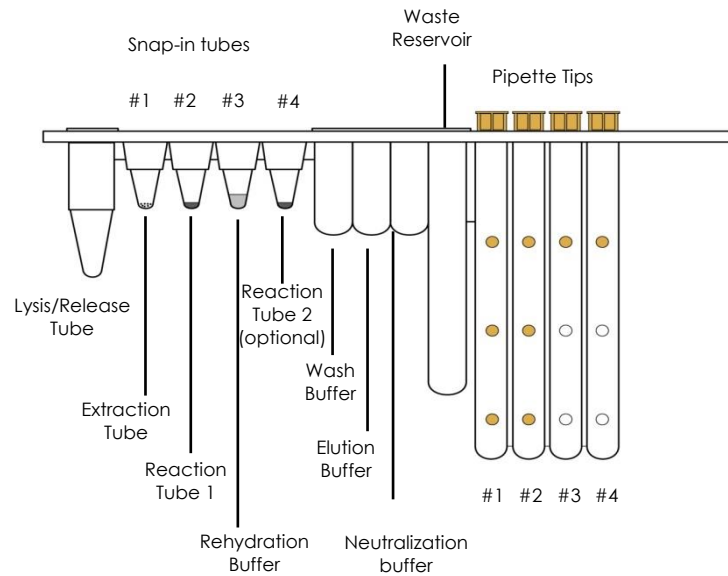
- 11) Click the "Save Test" button.

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 the pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (green 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.
 - i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange 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.



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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 S gene (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 Table 5.

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

-Results should be read and analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA Not Detected
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Detected
-	-	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.
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	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

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.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. 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 diluting the sample 1:10 to check for possible problems of inhibition.

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.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- 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 suspicious samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combination for detection of the *S* gene used in VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit designed for the detection of SARS-CoV-2, 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 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. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 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 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 infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.



- A negative result does not preclude the presence of SARS-CoV-2 virus RNA in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest COVID-19 infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit 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 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

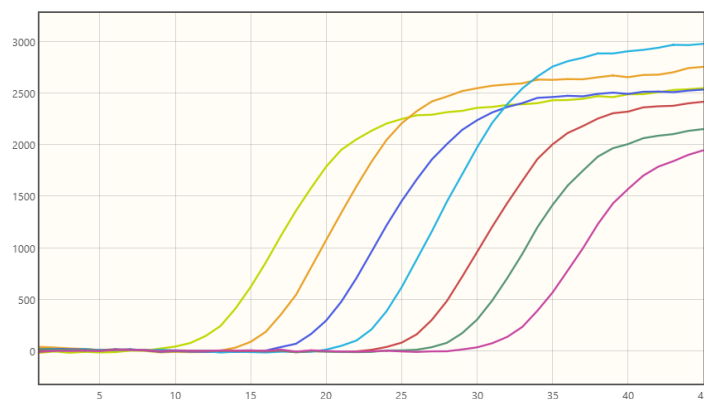
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical suspicion of COVID-19 disease or other similar respiratory diseases. Four SARS-CoV-2 positive samples were found and these results were in agreement with a PCR test developed according to the China CDC Primers and probes for detection 2019-nCoV. Additionally, the 4 SARS-CoV-2 positive samples were confirmed using a molecular detection method by the Spanish National Reference Center (Institute of Health Carlos III (ISCIII)) (the protocol "2019-nCoV by real-time RT-PCR" suggested by Charité (Berlin), with modifications).

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect SARS-CoV-2 using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 24 cDNA copies per reaction (cp/rxn) with a positive rate of $\geq 95\%$.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 *S* gene (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 *S* gene assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Human rhinovirus type C	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, 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.



DANSK

1. Anvendelsesformål

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit er designet til specifik identifikation og differentiering af 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) i respirationsprøver fra patienter med tegn og symptomer på COVID-19-infektion. Denne test er beregnet som en hjælp til identifikation af COVID-19 i kombination med patientens kliniske tegn og symptomer og epidemiologiske risikofaktorer. Analysen anvender BD MAX™-systemet til automatisk ekstraktion af RNA og efterfølgende realtids-PCR med anvendelse af de medfølgende reagenser kombineret med universelle reagenser og engangsartikler til BD MAX™-systemet. RNA fra respirationsprøver detekteres ved hjælp af fluorescerende rapportørfarveprober, der er specifikke for SARS-CoV-2.

2. Oversigt og forklaring

Coronavirus er indkapslede ikke-segmenterede positivt polariserede RNA-vira og tilhører Coronaviridae-familien [1,2]. Seks coronavirusarter vides at forårsage sygdomme hos mennesker [2]. Fire vira (229E, OC43, NL63 og HKU1) forårsager almindelige forkølelssymptomer, og de to andre (svært akut respiratorisk syndrom coronavirus (SARS-CoV) og Mellemøstens respiratoriske syndrom coronavirus (MERS-CoV)) er zoonotiske og forårsager mere alvorlige komplikationer [2]. SARS-CoV og MERS-CoV har forårsaget mere end 10.000 kumulative tilfælde i de seneste to årtier med en dødelighed på 34 % MERS-CoV og 10 % SARS-CoV [1,3].

I december 2019 havde nogle mennesker, der arbejdede på eller boede omkring Huanan skaldyrsmarked i Wuhan, Hubei-provinsen i Kina, lungebetændelse af ukendt årsag [2,4]. Dyb sekvensanalyse af respirationsprøverne indikerede en ny coronavirus, som først fik navnet 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) og for nylig SARS-CoV-2 [5].

Overførsel af SARS-CoV-2 fra menneske til menneske er blevet bekræftet, selv i inkubationsperioden uden symptomer, og viruset forårsager alvorlige luftvejslidelser, som ligner dem SARS-CoV frembragte [1,6,7]. Selv om lungebetændelse er den hyppigste sygdom, har enkelte patienter udviklet svær lungebetændelse, lungeødem, akut åndedrætsbesvær eller multiorgansvigt og død [1,4]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) mener, at symptomer på SARS-CoV-2 kan opstå i løbet af så få som 2 dage eller så længe som 14 dage efter eksponering, hvor de mest almindelige symptomer er feber, hoste, myalgi og dyspnø [1,4,8]. Mindre almindelige symptomer er ondt i halsen, hovedpine, diarré og opkastning [1,4]. Det ser ud til, at ældre mænd med komorbiditeter rammes hyppigere [4].

Diagnosticering af SARS-CoV-2 udføres ved tidlig påvisning af konventionelle årsager til lungebetændelsen og påvises ved next-generation-sekventering- eller realtids RT-PCR-metoder [1,9]. Adskillige analyser, der påviser SARS-CoV-2, er i øjeblikket tilgængelige og opført på WHO's (Verdenssundhedsorganisationens) websted <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO anbefaler prøver fra de øvre luftveje (nasofaryngeale og orofaryngeale pødepindsprøver) og/eller prøver fra de nedre luftveje (sputum, endotrakeal aspirat eller bronkoalveolær skylning) til identifikation af SARS-CoV-2 [9,11]. Derudover kan der udtages andre kliniske prøver såsom blod, urin og afføring for at overvåge tilstedeværelsen af viruset [9,11].



3. Procedurens princip

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit er designet til identifikation af SARS-CoV-2 i respirationsprøver. Detektionen foretages i et trins realtids RT-PCR-format, hvor den omvendte transkription og den efterfølgende forstærkning af den specifikke målsekvens finder sted i samme reaktionsbrønd. Det isolerede RNA-mål transkriberes og genererer komplementær DNA ved revers transkriptase, som efterfølges af forstærkning af et konserveret område af *S*-gene ved hjælp af specifikke primere og en fluorescensmærket probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit er baseret på 5' exonuklease-aktivitet fra DNA-polymerase. Under DNA-forstærkningen spalter dette enzym proben, som er bundet til den komplementære DNA-sekvens og adskiller quencher-farvestoffet fra rapportøren. Denne reaktion genererer en stigning i det fluorescerende signal, som er proportional med mængden på målskabelonen. Denne fluorescens måles af BD MAX™-systemet.

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit indeholder i hvert rør alle de komponenter, der er nødvendige til at foretage PCR-analyser i realtid (specifikke primere/prober, dNTPS, buffer, polymerase) i et stabiliseret format samt en intern kontrol til overvågning af PCR-hæmning. SARS-CoV-2 forstærkes og påvises i kanal 475/520 og den interne kontrol (IC) i kanal 530/565.

4. Leverede reagenser

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection kit indeholder følgende materialer og reagenser, som er beskrevet i Tabel 1:

Reference	Reagens/Materiale	Beskrivelse	Farve	Mængde
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S gene</i> reaction tube	En blanding af enzymer, primerprober, buffere, dNTP'er, stabilisatorer og interne kontroller i stabiliseret format	Gennemsigtig grøn folie	2 poser med 12 rør
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Opløsning til rekonstitution af det stabiliserede produkt	Gennemsigtig orange folie	1 pose med 24 rør

Tabel 1. Reagenser og materialer leveret i VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection kit med ref. VS-NCO124 (444212).

5. Reagenser og udstyr, der skal leveres af brugeren

Følgende liste omfatter de materialer og det udstyr, der kræves til brug, men som ikke er inkluderet i VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøjagtighed mellem 2 og 1000 µl).
- Filterspidser.



- Pulverfrie engangshandsker

6. Transport- og opbevaringsforhold

- Sættene kan sendes og opbevares ved 2 - 40 °C, indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten.
- Efter åbning af aluminiumsposerne, som indeholder reaktionsrørene, kan de anvendes i op til 28 dage.

7. Særlige forholdsregler for brugere

- Produktet er tiltænkt professionelle brugere, såsom laboratorie- eller sundhedspersonale og teknikere, der er uddannet i molekylærbiologiske teknikker.
- Til in vitro-diagnostisk brug.
- Brug ikke reagenser og/eller materialer, hvis udløbsdatoen er overskredet.
- Brug ikke sættet, hvis etiketten, der forseglers den ydre æske, er i stykker.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesæsken er åben eller i stykker ved ankomsten.
- Brug ikke reagenser, hvis beskyttelsesposerne er åbne eller i stykker ved modtagelsen.
- Brug ikke reagenser, hvis tørremidlet ikke er til stede eller er i stykker inden i reagensposerne.
- Tørremidlet må ikke fjernes fra reagensposerne.
- Luk straks de beskyttende poser med reagenser med lynlåsforsøglingen efter hver brug. Fjern eventuel overskydende luft i poserne inden forsegling.
- Brug ikke reagenser, hvis folien er blevet ødelagt eller beskadiget.
- Reagenser fra forskellige poser og/eller sæt og/eller partier må ikke blandes.
- Beskyt reagenser mod fugt. Længerevarende eksponering for fugt kan påvirke produktets ydeevne.
- Hold komponenterne væk fra lys.
- I tilfælde, hvor andre PCR-tests udføres i det samme generelle område af laboratoriet, skal det omhyggeligt sikres, at VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 ekstraktionskit, eventuelle yderligere reagenser, der er påkrævede til testen og BD MAX™-systemet ikke er kontamineret. Undgå altid mikrobiel kontaminering og kontaminering af reagenser med ribonuklease (RNase)/deoxyribonuklease (DNase). Det anbefales at anvende sterile RNase/DNase-fri aerosolresistente engangspipettespidser eller positive fortrængningspipettespidser. Brug en ny spids til hver prøve. Handsker skal udskiftes før håndtering af reagenser og kassetter.
- For at undgå kontaminering af miljøet med amplikoner må BD MAX™ PCR Cartridge ikke brækkes fra hinanden efter brug. Forseglingerne på BD MAX™ PCR-Cartridge er designet til at forhindre kontaminering.
- Tilrettelæg en ensrettet arbejdsgang. Den skal begynde i ekstraktionsområdet og derefter flyttes til forstærknings- og detektionsområdet. Prøver, udstyr og reagenser må ikke returneres til det område, hvor det foregående trin blev udført.
- Følg god laboratoriepraksis. Brug beskyttelsestøj, engangshandsker, beskyttelsesbriller og maske. Man må ikke spise, drikke eller ryge i arbejdsområdet. Vask hænder efter endt test.
- Prøverne skal behandles som potentielt smitsomme samt alle reagenser og materialer, der er blevet eksponeret for prøverne, og skal håndteres i overensstemmelse med de nationale sikkerhedsforskrifter. Træf de nødvendige forholdsregler under indsamling, opbevaring, behandling og bortskaffelse af prøver.
- Regelmæssig dekontaminering af almindeligt anvendt udstyr anbefales, især mikropipetter og arbejdsflader.



- Se brugervejledningen til BD MAX™-systemet for yderligere advarsler, forholdsregler og procedurer.

8. Analysemetode

8.1. INDSAMLING, OPBEVARING OG TRANSPORT AF PRØVER

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit er blevet valideret på negative nasofaryngeale/orofaryngeale podepinde opsamlet i virale transportmedier (VTM) (Viracell S.L., Spanien) og nukleinsyre isoleret fra positive nasofaryngeale/orofaryngeale podepinde opsamlet i VTM.

En anden type prøver fra nasofaryngeale/orofaryngeale podepinde i VTM skal valideres af brugeren.

Prøveudtagning, opbevaring og transport skal vedligeholdes i overensstemmelse med de betingelser, der er valideret af brugeren. Samlet set bør respirationsprøver indsamles og mærkes på passende vis i rene beholdere med eller uden transportmedier (afhængigt af prøvetype) og behandles så hurtigt som muligt for at sikre testens kvalitet. Prøverne skal transporteres ved 2 til 8 °C i op til 48 timer i henhold til lokale og nationale bestemmelser for transport af patogen materiale. Ved langtidstransport (mere end 48 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤-20 °C. Det anbefales at anvende friske prøver til testen. Prøverne kan opbevares ved 2 til 8 °C i op til 48 timer eller nedfryses ved -20 °C eller ideelt ved -70 °C for konservering. Gentagne fryse-tø-cykler bør undgås for at forhindre nedbrydning af prøven og nukleinsyrer.

8.2. KLARGØRING AF PRØVER OG RNA-EKSTRAKTION

Udfør prøveklargøringen i henhold til anbefalingerne i brugsanvisningen til det anvendte ekstraktionskit, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Bemærk, at nogle andre prøver kan kræve forbehandling. Brugeren skal udvikle og validere ekstraktions- og præparationsprocedurer, der er specifikke til formålet.

1. Der pipetteres mellem 200 µl og 750 µl fra nasofaryngeale/orofaryngeale podepindsprøver opsamlet i virale transportmedier (VTM) over i et BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube, og røret lukkes med en septumhætte. Der sikres fuldstændig blanding ved at hvirvle prøven ved høj hastighed i 1 minut. Fortsæt til BD MAX™ Systembetjening.

8.3. PCR-PROTOKOL

Bemærk: Der henvises til brugervejledningen til BD MAX™-systemet for at få detaljerede instruktioner.

8.3.1. Oprettelse af PCR-testprogram for VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit

Bemærk: Hvis du allerede har gennemgået VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection-testen kan du springe trin 8.3.1 over og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Vælg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klik på knappen "Create" (Opret).
- 3) I vinduet "Test Name" (Testnavn) skal du navngive din test: dvs. VIASURE SARS-CoV-2 S-gene.



- 4) Vælg "Extraction Type" (Ekstraktionstype) i rullemenuen "ExK TNA-3".
- 5) Vælg "Type 5" i rullemenuen "Master Mix Format".
 - a. Bemærk: Produktet kan anvendes i kombination med en ekstra VIASURE til BD MAX test, og vælg derefter "Dual Master Mix Concentrated Lyofized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) I "Sample extraction parameters" (prøveekstraktionsparametre) vælges "User defined" (brugerdefineret), og prøvevolumen justeres til volumen af den anvendte kliniske prøve plus 500 µl.
 - a. Eksempel: Hvis der pipetteres 200 µl klinisk respirationsprøve over i et BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, indstilles parameteren til 700 µl.
 - b. Bemærk: Den maksimale indstilling er 950 µl.
- 7) I "Ct Calculation" (Ct-beregning) vælges "Call Ct at Threshold Crossing" (Beregn Ct når tærsklen krydses).
- 8) Indtast følgende parametre på fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger): "Channel Settings" (Kanalindstillinger), "Gains" (Stigninger) og "Threshold" (Tærskel) (Tabel 2).
 - a. Bemærk: Produktet kan anvendes i kombination med en ekstra VIASURE til BD MAX-test, "PCR settings" (PCR-indstillinger) og "Test Steps" (Testtrin) skal gennemføres for position 2 (grøn) og position 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias	Gain (Stigning)	Threshold (Tærskel)	Ct Min (Ct. min)	Ct Max (Ct. max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S-gen	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabel 2. PCR-indstillinger.

Bemærk: Det anbefales som udgangspunkt at fastsætte ovennævnte minimumstærskelværdier for hver kanal, men de endelige indstillinger skal fastlægges af slutbrugeren under resultatfortolkningen for at sikre, at tærskelværdierne falder inden for fluorescenskurvernes eksponentielle fase og over ethvert baggrundssignal. Tærskelværdien for forskellige instrumenter kan variere på grund af forskellige signalintensiteter.

- 9) I fanen "PCR settings" (PCR-indstillinger) indtastes følgende parametre samt "Spectral Cross Talk" (Spektral krydstale) (tabel 3)

		False Receiving Channel (Falsk modtagekanal)				
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	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	-

Tabel 3. Parametre for spektral krydstale.



- 10) Indtast PCR-protokollen (tabel 4) på fanen "Test Steps" (Testtrin).

Step Name (Trinnavn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Cyklusser)	Time (s) (Tid (sek.))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detekter)
Revers transskription	Hold	1	900	45°C	-
Indledende denaturering	Hold	1	120	98°C	-
Denaturering og annotering/udvidelse (dataindsamling)	2-temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabel 4. PCR-protokol.

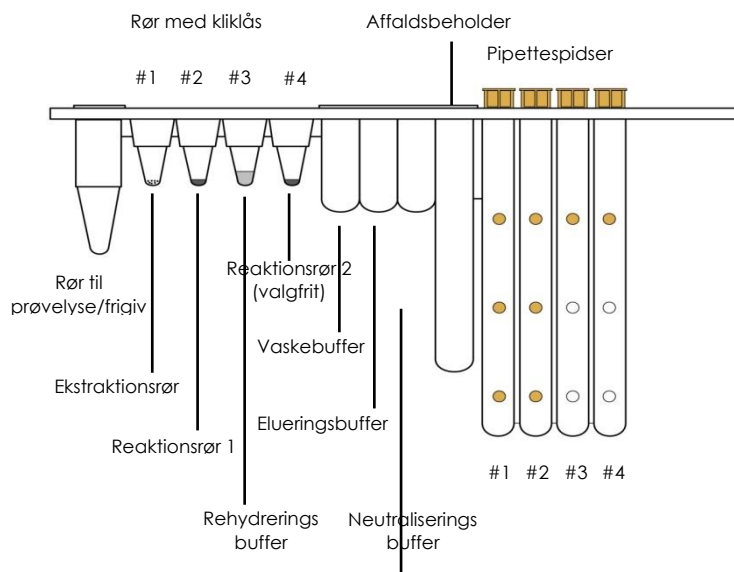
- 11) Klik på knappen "Save Test" (Gem test).

8.3.2. Opsætning af BD MAX™-stativ

- For hver prøve, der skal testes, fjernes en Unitized Reagent-strimmel fra BD MAX™ ExK TNA-3 sættet. Bank forsigtigt hver strimmel mod en hård overflade for at sikre, at alle væskerne ligger i bunden af rørene, og anbring dem i BD MAX™-systemets prøvestativer.
- Fjern det påkrævede antal BD MAX™ ExK TNA-ekstraktionsrør (B4) (hvid folie) fra deres beskyttelsespose. Sæt udtræksrøret (-rørene) (hvid folie) i de tilsvarende positioner i TNA-strimlen (fastgør position 1, hvid farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
- Identificer og adskil det rette antal VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (grøn folie), og klik dem på plads i deres tilsvarende positioner på strimmel (Klik-position 2, grøn farvekodning på stativet. Se Figur 1).
 - Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
 - Rehydreringen udføres korrekt ved at sørge for, at det frysetørrede produkt ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforseglingen.
 - Bemærk: Hvis du vælger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilised MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (afsnit 8.3.1), bestemmes og adskilles det passende antal ekstra VIASURE reaktionsrør (forskellig folie) og klikkes fast i deres tilsvarende positioner i strimlen (klik-position 4, blå farvekodning på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
- Fjern det nødvendige antal Rehydration Buffer tubes (orange folie), og klik dem fast på deres tilsvarende pladser på strimlen (klik position 3, ikke-farvet kodning fast på stativet. Se Figur 1). Fjern overskydende luft, og luk aluminiumsposerne med lynlåsforseglingen.
 - For at sikre, at overførslen udføres korrekt, skal man sørge for, at væsken ligger i bunden af røret og ikke er i kontakt med rørets top eller folieforseglingen.



Figur 1. BD MAX™ TNA reagensstrimmel (TNA) fra BD MAX™ ExK TNA-3 sættet.



8.3.3. BD MAX™ Instrumentopsætning

- 1) Vælg fanen "Work List" (Arbejdsliste) på skærmen "Run" (Kør) på BD MAX™ Systemsoftware v4.50A eller nyere.
- 2) Vælg VIASURE SARS-CoV-2 S gene i rullemenuen "Test" (hvis det ikke allerede er oprettet, se afsnit 8.3.1).
- 3) Vælg det relevante lotnummer for kittet (fremgår af ekstraktionskittets udvendige æske) fra rullemenuen (valgfrit).
- 4) Indtast prøvebufferrørets identifikationsnummer i vinduet "Sample tube" (Prøverør) på "Work list" (Arbejdsliste), enten ved at scanne strejkoden med scanneren eller ved manuel indtastning.
- 5) Udfyld vinduet Specimen/Patient ID og/eller Accession på "Work list" (arbejdsliste), og klik på knappen "Save" (Gem). Fortsæt, indtil alle prøvebufferrør er indtastet. Sørg for, at prøve-/patient-id'et og prøvebufferrørene matcher nøjagtigt.
- 6) Anbring det klargjorte prøvebufferrør i BD MAX™-stativet/stativerne.
- 7) Sæt stativet/stativerne i BD MAX™-systemet (stativ A er placeret i venstre side af BD MAX™-systemet og stativ B i højre side).
- 8) Anbring det nødvendige antal BD MAX™ PCR Cartridges i BD MAX™-systemet.
- 9) Luk lågen til BD MAX™-systemet.
- 10) Klik på "Start Run" (Start procedure) for at starte proceduren.

8.3.4. BD MAX™ rapport

- 1) Klik på knappen "Results" (Resultater) i hovedmenuen.
- 2) Dobbeltklik enten på din kørsel på listen, eller tryk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klik på "Print" (Udskriv), vælg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kør detaljer, testdetaljer og tegn grafik).
- 4) Klik på knappen "Print or Export" (Udskriv eller Eksporter) eller på skærmen "Run Reports" (Kør rapporter).



9. Tolkning af resultater

For en detaljeret beskrivelse af, hvordan man analyserer data, se BD MAX™-systemets brugervejledning.

Analysen af data udføres som BD MAX™-software i overensstemmelse med producentens anvisninger. BD MAX™-softwaren rapporterer Ct-værdier og stigningskurver for hver detektor kanal for hver prøve, og testes på følgende måde:

- En Ct-værdi på 0 angiver, at der ikke blev beregnet nogen Ct-værdi af softwaren ved den angivne tærskelværdi (se tabel 2). En forstærkningskurve for prøven, der viser en Ct-værdi på "0", skal kontrolleres manuelt.
- Ct-værdien -1 angiver, at ingen forstærkningskurve er forekommet.
- Enhver anden Ct-værdi skal fortolkes i sammenhæng med forstærkningskurve og i overensstemmelse med retningslinjerne for tolkning af prøven som anført i Tabel 5.

Kontrollér, at det indvendige styresignal fungerer korrekt for amplifikationsblandingen. Desuden skal du kontrollere, at der ikke foreligger nogen rapport over BD MAX™ Systemfejl.

-Resultaterne skal læses og analyseres ved hjælp af følgende tabel:

SARS-CoV-2 S gen (475/520)	Intern kontrol (530/565)	Fortolkning
-	+	SARS-CoV-2 S gen-RNA ikke påvist
+	+/-	SARS-CoV-2 S gen-RNA påvist
-	-	Resultatet Unresolved (uløst) (UNR) optræder under tilstedeværelse af hæmmere i PCR-reaktionen eller når der opstår et overordnet problem (der ikke rapporteres med en fejlkode) under prøvebehandlingen og/eller forstærkningstrinnene.
IND	IND	Analyseresultatet er Indeterminate (ubestemmeligt) (IND). Skyldes en fejl i BD MAX™-systemet. Analyseresultat, der vises i tilfælde af en instrumentfejl, der knyttet til en fejlkode.
INC	INC	Analyseresultatet er Incomplete (ufuldstændigt) (INC). Skyldes fejl i BD MAX™-systemet. Analyseresultatet vises, hvor en fuldstændig kørsel ikke kunne gennemføres.

Tabel 5. Prøvefortolkning

+: Der opstod forstærkning

-: Der opstod ingen forstærkning

En prøve betragtes som positiv, hvis Ct-værdien er mindre end 40. Den interne kontrol kan vise et forstærkningssignal, fordi et stort antal målkopier kan medføre præferentiel forstærkning af målspecifikke nukleinsyrer i stedet for den interne kontrol. I disse tilfælde er undersøgelse af IC ikke nødvendig.

En prøve betragtes som negativ, hvis prøven viser intet forstærkningssignal, men den interne kontrol er positiv. En hæmning af PCR-reaktioner kan udelukkes ved forstærkningen af intern kontrol.



I tilfælde af uløste resultater (UNR), manglende internt kontrolsignal i en negativ prøve anbefales det at gentage analysen ved en prøvefortynding på 1:10 for at kontrollere for eventuelle problemer med hæmning.

Resultaterne af testen bør vurderes af en læge på baggrund af anamnese, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.

10. Begrænsninger i testen

- Resultaterne af testen bør vurderes af en læge på baggrund af anamnese, kliniske symptomer og andre diagnostiske tests.
- Selv om denne test kan bruges sammen med andre typer prøver er den blevet valideret med nasofaryngeale/orofaryngeale pødepinde indsamlet i VTM.
- Kvaliteten af testen afhænger af prøvens kvalitet; nukleinsyrer fra respirationsprøver skal udvindes korrekt.
- Meget lave målniveauer under detektionsgrænsen kan påvises, men resultaterne er muligvis ikke reproducerbare.
- Der er mulighed for falske-positive resultater som følge af krydskontaminering af SARS-CoV-2-mistænkte prøver, der indeholder høje koncentrationer af mål-RNA eller er kontaminerede med PCR-produkter fra tidligere reaktioner.
- Den specifikke kombination af primer og probe til påvisning af S-genet, der anvendes i VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, der designet til at påvise SARS-CoV-2, udviser ikke signifikante kombinerede homologier med det humane genom, human mikroflora, SARS-CoV eller andre coronavira, hvilket kan resultere i forudsigelige falsk-positive resultater.
- Falsk-negative resultater kan opstå fra flere faktorer og deres kombinationer, herunder:
 - Forkerte prøveopsamlings-, transport-, opbevarings- og/eller håndteringsmetoder.
 - Forkerte behandlingsprocedurer (herunder RNA-ekstraktion).
 - Nedbrydning af det virale RNA under forsendelse/opbevaring og/eller behandling af prøver.
 - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probebindingsområder kan påvirke detektion af nye eller ukendte SARS-CoV-2-varianter.
 - En virusbelastning i prøven under detektionsgrænsen for analysen.
 - Tilstedeværelsen af RT-qPCR-hæmmere eller andre typer interfererende stoffer. Virkningerne af vacciner, antivirale lægemidler, antibiotika, kemoterapeutika eller immunsuppressive lægemidler, der anvendes til at forebygge COVID-19 eller anvendes under behandling af infektionen.
 - Manglende overholdelse af brugsanvisningen og analyseproceduren.
- Negative resultater udelukker ikke SARS-CoV-2-infektion og bør ikke anvendes som eneste grundlag for behandling eller andre beslutninger om patientbehandling. Optimale prøvetyper og tidspunktet for maksimale virusniveauer under infektioner forårsaget af SARS-CoV-2 er ikke fastlagt. Det kan være nødvendigt at indsamle flere prøver (typer og tidspunkter) fra samme patient for at påvise virusset.
- Hvis diagnostiske test for andre luftvejssygdomme er negative, og patientens kliniske præsentation og epidemiologiske oplysninger antyder, at SARS-CoV-2-infektion er mulig, bør et falsk negativt resultat overvejes, og en ny test af patienten bør drøftes.



- Et negativt resultat udelukker ikke tilstedeværelsen af SARS-CoV-2 virus-RNA i en klinisk prøve. Hvis kliniske observationer, patientanamnesen og epidemiologiske oplysninger antyder infektion med COVID-19, bør det overvejes at gentage testen med en øget prøvevolumen.
- I tilfælde af uløste eller ufuldstændige resultater med VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit er det nødvendigt at gentage testen. Uløste resultater kan skyldes tilstedeværelsen af antistoffer i prøven eller forkert rehydrering af frysetørrede reaktionsblandingsrør. Hvis der opstår en instrumentfejl, kan det medføre ubestemmelige eller ufuldstændige resultater.

11. Kvalitetskontrol

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit indeholder en intern kontrol (IC) i hver reaktion, hvilket bekræfter korrekt udførelse af teknikken.

12. Ydelseskarakteristika

12.1. Klinisk sensitivitet og specificitet

De kliniske resultater af VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit blev testet med 4 nukleinsyrer isoleret fra positive nasofaryngeale og/eller orofaryngeale pødepinde indsamles i VTM og 15 prøver (nasofaryngeale og/eller orofaryngeale pødepinde allerede hos VTM) fra patienter med klinisk mistanke om sygdommen COVID-19 eller andre lignende luftvejssygdomme. Fire 4 SARS-CoV-2 positive prøver blev fundet og disse resultater stemmer overens med en PCR-test, der blev udviklet på baggrund af China CDC-primere og prøber til detektion af SARS-CoV-2.

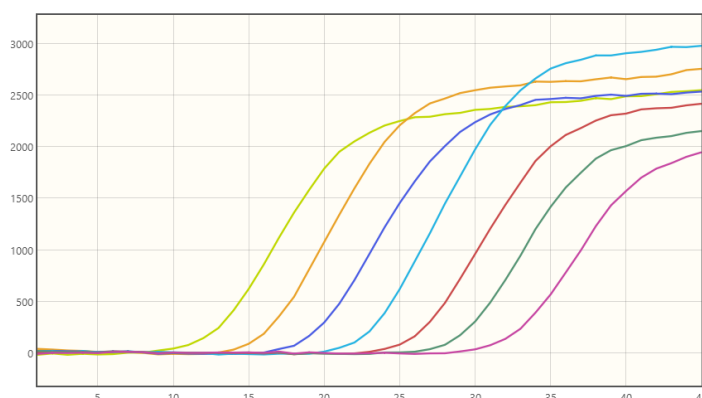
Derudover blev 4 SARS-CoV-2 positive prøver bekræftet via en molekylær detektionsmetode af Spanish National Reference Center (Institute of Health Carlos III (ISCIII))(protokollen "2019-nCoV af real-time RT-PCR", som foreslået af Charité (Berlin), med modifikationer).

Det kan konkluderes, at resultaterne viser en høj sensitivitet og specificitet med hensyn til påvisningen af SARS-CoV-2 vha. VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit har en detektionsgrænse på ≥ 24 cDNA-kopier pr. reaktion (cp/rxn) med en positivrate på ≥ 95 %.



Figur 2. Fortyndingsserier af SARS-CoV-2 S gen ($2,4 \cdot 10^7$ - $2,4 \cdot 10^1$ cp/rxn) prøve kørsel på BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).

12.3. Analytisk specificitet

Specificiteten af SARS-CoV-2 S gentesten blev bekræftet ved at teste et panel bestående af forskellige mikroorganismer, der repræsenterer de mest almindelige respiratoriske patogener. Der blev ikke påvist krydsreaktivitet mellem nogen af følgende testede mikroorganismer:

Krydsreaktivitetstest					
Human Adenovirus-type 1-5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-lignende virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Humant Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09-virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)-virus	-	Human metapneumovirus A og B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A og C	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)-virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 og 4 vira	-
Human coronavirus 229E OG OC43, NL63 og HKU1	-	Influenza A/Switzerland/1/2013 (H3N2)-virus	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 og g885652	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-lignende virus	-	Human rhinovirus type C	-
SARS Coronavirus-stamme Frankfurt 1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. Aureus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-virus	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratorisk syncytialvirus (RSV) A og B	-

Tabel 6. Reference patogener mikroorganismer, som anvendes i denne undersøgelse.



12.4. Analytisk reaktivitet










Reaktiviteten af VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit blev evalueret mod Human 2019-nCoV-stamme BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV-stamme 2019-nCoV/Italy-INMI1, syntetiske RNA-kontroller for to varianter af SARS-CoV-2-virus: MT007544.1 (SARS-CoV2-isolat Australia/VIC01/2020) og MN908947.3 (SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1), viser positivt resultat.

13. Bibliography/Bibliografi

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. December 2019. Tilgængelig fra <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Tilgået marts 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. Sundhedsministeriet. Den spanske regering. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Opdateret 27/02/2020. Tilgængelig fra https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Tilgået marts 2020.
6. 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.
7. 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.
8. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Tilgængelig fra <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Tilgået marts 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance.17. januar 2020. Tilgængelig fra <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Tilgået marts 2020.
10. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Tilgængelig fra <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Tilgået marts 2020.
11. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Foreløbig vejledning. 27. februar 2020. Tilgængelig fra [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)). Tilgået marts 2020.



14. Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og -reagenser

	<p><i>In vitro</i> diagnostic device In vitro-diagnostisk udstyr</p>		<p>Keep dry Opbevares tørt</p>		<p>Use by Anvendes inden</p>		<p>Manufacturer Producent</p>		<p>Batch code (Lot) Batch-kode (parti)</p>
	<p>Consult Instructions for Use Se brugsanvisning</p>		<p>Temperature limitation Temperaturbegrænsning</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Indeholder nok til <n> tests</p>	DIL	<p>Sample diluent Prøvefortynding</p>		<p>Catalognumber Katalognummer</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



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC