

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Handbuch für folgende Medizinprodukte/

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System
zur Verwendung mit dem BD MAX™ System



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) (Vircell 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				
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.

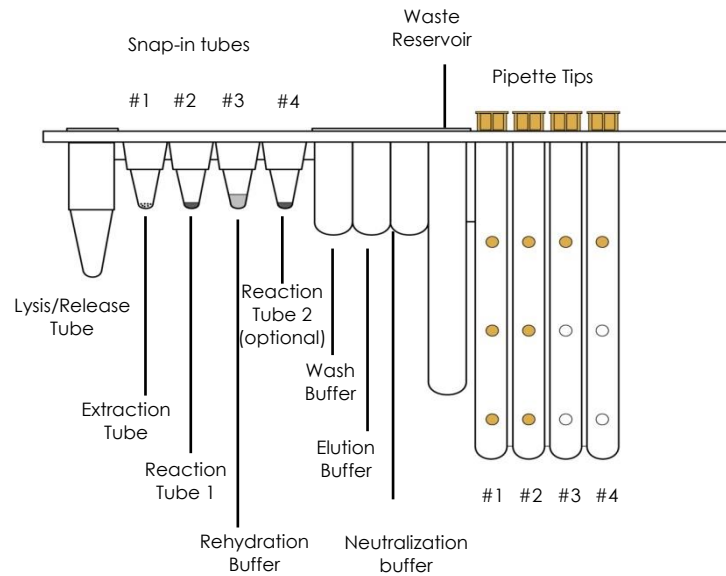
- 11) Click the "Save Test" button.

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

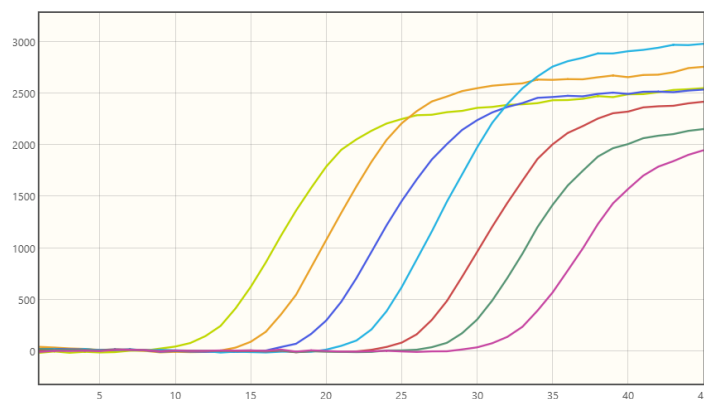
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical 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.



DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Der VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit ist vorgesehen für die spezifische Identifizierung und Differenzierung des neuartigen Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) in Atemwegsproben von Patienten mit den Symptomen einer COVID-19-Infektion. Dieser Test soll die Identifizierung bei der Diagnostik von COVID-19 in Kombination mit den klinischen Symptomen und epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten erleichtern. Der Assay verwendet das BD MAX™ System zur automatisierten RNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-PCR durch Einsatz der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems. Hierzu wird Virus-RNA in Atemwegsproben mit für SARS-CoV-2 spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-Reportersonden nachgewiesen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Coronaviren sind behüllte RNA-Viren mit nicht-segmentiertem positivsträngigem Genom, die zur Familie *Coronaviridae* gehören [1,2]. Es sind sechs Coronavirus-Spezies bekannt, die beim Menschen Krankheiten verursachen [2]. Vier Viren (229E, OC43, NL63 und HKU1) lösen Symptome grippaler Infekte aus, die anderen beiden (das SARS-assoziierte Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus, SARS-CoV) und das MERS-Coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV)) sind zoonotische Viren und verursachen schwerwiegendere Komplikationen [2]. SARS-CoV und MERS-CoV haben in den letzten beiden Jahrzehnten zu mehr als 10.000 kumulativen Fällen geführt, wobei die Mortalitätsrate bei einer MERS-CoV-Infektion 34 % und bei einer SARS-CoV-Infektion 10 % betrug [1,3].

Im Dezember 2019 trat bei einigen Personen, die im Großhandelsmarkt Huanan für Meeresfrüchte in Wuhan in der Provinz Hubei, China, arbeiteten oder in dessen Umgebung wohnten, eine Lungenentzündung unbekannter Ursache auf [2,4]. Die Analyse der Atemwegsproben von Erkrankten durch Tiefensequenzierung wies auf ein neuartiges Coronavirus hin, das zunächst als „2019 neuartiges Coronavirus (2019-nCoV)“ und später als „SARS-CoV-2“ bezeichnet wurde [5].

Die Übertragung des SARS-CoV-2 von Mensch zu Mensch, selbst während der symptomlosen Inkubationszeit, wurde bestätigt. Das Virus verursacht eine schwere Atemwegserkrankung ähnlich der, die das SARS-CoV auslöst [1,6,7]. Die Lungenentzündung ist war die primäre mit dem Virus assoziierte Erkrankung, jedoch kam es bei einigen Patienten zu schwerer Pneumonie, Lungenödem, akutem Atemnotsyndrom, Multiorganversagen und zum Tod [1,4]. Laut den Centers of Disease Control and Prevention (CDC) können die Symptome einer SARS-CoV-2-Infektion bereits 2 Tage oder auch erst 14 Tage nach der Exposition auftreten, wobei die häufigsten Fieber, Husten, Muskelschmerzen und Atemnot sind [1,4,8]. Weniger häufige Symptome sind Halsschmerzen, Kopfschmerzen, Durchfall und Erbrechen [1,4]. Der Krankheitsverlauf scheint bei älteren Männern mit Begleiterkrankungen schwerer zu sein [4].

Die Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion erfolgt zunächst durch Abklärung der üblichen Ursachen einer Lungenentzündung sowie anschließenden Nachweis mittels Sequenzierung der nächsten Generation oder Real-Time-PCR-Methoden [1,9]. Aktuell sind verschiedene Assay zum Nachweis von SARS-CoV-2 verfügbar und auf der



Website der WHO (Weltgesundheitsorganisation) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10] aufgelistet.

Die WHO empfiehlt zur Identifikation von SARS-CoV-2 Proben aus den oberen Atemwegen (nasopharyngeale und oropharyngeale Abstriche) und/oder Proben aus den unteren Atemwegen (Sputum, endotracheales Aspirat oder bronchoalveoläre Lavage) [9,11]. Darüber hinaus können weitere klinische Proben wie Blut, Urin und Stuhl gesammelt werden, um das Vorliegen des Virus zu überwachen [9,11]

3. Verfahrensprinzip

Der VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit wurde für die Identifizierung von SARS-CoV-2 in Atemwegproben entwickelt. Der Nachweis erfolgt im Ein-Schritt-Echtzeit-RT-PCR-Verfahren, bei dem die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Das isolierte RNA-Target wird durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA transkribiert, woraufhin die Amplifikation und der Nachweis einer konservierten Region des *S*-Gens mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde erfolgen.

Das VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Template proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

Das VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase) in stabilisierter Form sowie eine interne PCR-Inhibitionskontrolle. SARS-CoV-2 wird im Kanal 475/520, die interne Kontrolle im Kanal 530/565 amplifiziert und detektiert.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Im VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit sind die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien und Reagenzien enthalten:

Referenznummer	Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe	Menge
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S gene</i> reaction tube	Eine Mischung aus Enzymen, Primersonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und interner Kontrolle in stabilisierter Form	Transparente grüne Folie	2 Beutel mit je 12 Röhrchen
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	Transparente orangefarbene Folie	1 Beutel mit 24 Röhrchen

Tabelle 1. Im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit mit Ref.-Nr. VS-NCO124 (444212) enthaltene Reagenzien und Materialien.



5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

Nachfolgend sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kits enthaltenen Materialien aufgeführt.

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

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2°C bis 40°C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel können die darin enthaltenen Reaktionsgefäße bis zu 28 Tage verwendet werden.

7. Sicherheitshinweise für den Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für die Verwendung durch Fachpersonal, wie Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und Laboranten vorgesehen, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, das BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderlichen Reagenzien und das BD MAX™ System nicht



kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen Kontamination durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase)/Desoxyribonuklease (DNase). Es wird die Verwendung von RNase-/DNase-freien, aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen Handschuhe wechseln.

- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR-Cartridge nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR-Cartridge ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken oder rauchen. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, Lagerung, Verarbeitung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

8. Testverfahren

8.1. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -TRANSPORT

Das VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit wurde validiert anhand von negativen nasopharyngealen/ oropharyngealen Abstrichen, die in Virustransportmedium (VTM) (Vircell S.L., Spanien) entnommen wurden, sowie anhand von Nukleinsäure, die aus in VTM entnommenen positiven nasopharyngealen/ oropharyngealen Abstrichen isoliert wurde.

Andere Arten von Proben aus nasopharyngealen/ oropharyngealen Abstrichen in VTM müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind Atemwegsabstriche in einem sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten Gefäß mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) zu entnehmen und zur Gewährleistung der Testqualität so schnell wie möglich zu verarbeiten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material nicht länger als 48 Stunden bei 2 bis 8°C transportiert werden. Für den Langzeittransport (über 48 Stunden) empfehlen wir eine Beförderung bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 2 bis 8°C bis zu 48 Stunden lang oder zur Konservierung bei -20°C oder idealerweise bei -70°C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.



8.2. PROBENVORBEREITUNG UND RNA-EXTRAKTION

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

1. Pipettieren Sie zwischen 200 und 750 µl des in Virustransportmedium (VTM) entnommenen nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichs in ein BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Stellen Sie eine vollständige Vermischung sicher, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System fort.

8.3. PCR-PROTOKOLL

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

8.3.1. Erstellen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE SARS-CoV-2 S-Gen Real Time PCR Detection Kit

Hinweis: Wenn Sie den VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR-Detektionstest bereits erstellt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt zu Schritt 8.3.2 übergehen.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).
- 3) Benennen Sie im Fenster „Test Name“ Ihren Test, d. h.: VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. Wählen Sie in einem solchen Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert) und stellen Sie das Volumen auf das Volumen der Probenmenge plus 500 µl ein.
 - a. Beispiel: Wenn Sie 200 µl respiratorische klinische Probe in ein BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube pipettieren, stellen Sie Parameter auf 700 µl.
 - b. Hinweis: Die höchste Einstellung beträgt 950 µl.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.



8) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 2).

a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit einem zusätzlichen „VIASURE für BD MAX Test“ verwendet werden. In einem solchen Fall sind die PCR-Einstellungen und Testschritte für die Einrastposition 2 (grün) und Einrastposition 4 (blau) einzugeben.

Channel (Kanal)	Alias	Channel (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IK	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

Tabelle 2. PCR-Einstellungen.

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

9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 3) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	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	-	

Tabelle 3. Parameter für das spektrale Übersprechen.

10) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 4) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Zeit (s) (Time (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Umgekehrte Transkription	Hold	1	900	45°C	-
Initiale Denaturierung	Hold	1	120	98°C	-
Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung)	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabelle 4. PCR-Protokoll.

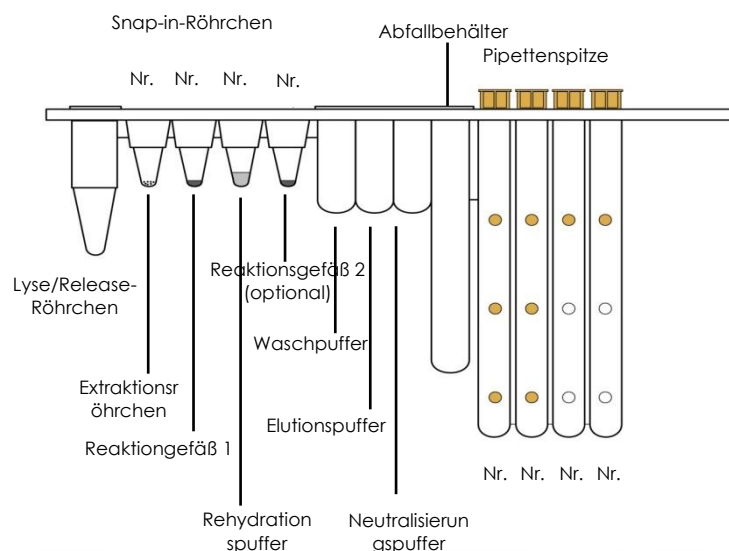
11) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).



8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, um sicherzustellen, dass sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK TNA Extraktionsröhrchen (B4) (weiße Folie) aus den Schutzbeuteln heraus. Lassen Sie das/die Extraktionsröhrchen (weiße Folie) in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an VIASURE SARS-CoV-2 S gene Reaktionsgefäße (grüne Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.
 - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)) (Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen VIASURE Reaktionsgefäßen (andersfarbige Folie) und lassen Sie sie in die entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydratation Buffer tubes (orangefarbene Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack. Siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
 - a. Stellen Sie für eine korrekte Überführung bitte sicher, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet.

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



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VIASURE SARS-CoV-2 S gene (falls nicht bereits erstellt, siehe 8.3.1).
- 3) Wählen Sie die entsprechende Chargennummer des Kits (an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits zu finden) aus dem Auswahlménü aus (optional).
- 4) Geben Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe ein.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Probenpufferröhrchen aus. Stellen Sie sicher, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.4. BD MAX™ Bericht

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

9. Ergebnisinterpretation

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

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

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 2). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.

- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.



- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 5 auszuwerten.

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

-Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle zu lesen und auszuwerten:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Interne Kontrolle (530/565)	Interpretation
-	+	SARS-CoV-2 S gene -RNA nicht nachgewiesen
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene -RNA nachgewiesen
-	-	Unresolved (UNR) Ungelöstes Testergebnis aufgrund der Präsenz von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten.
IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbares Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 5. Probenauswertung

+: Stattgefundenen Amplifikation

-: Keine Amplifikation

Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Die Anzeige oder Nicht-Anzeige eines Amplifikationssignals durch die interne Kontrolle ist darauf zurückzuführen, dass eine hohe Kopienzahl der Zielform eine präferenzielle Amplifikation der zielspezifischen Nukleinsäuren anstelle der internen Kontrolle hervorruft. In diesen Fällen ist der Nachweis durch die IK nicht erforderlich.

Eine Probe gilt als negativ, wenn vom Nachweissystem kein Amplifikationssignal in der Probe erfasst wird, die interne Kontrolle jedoch positiv ist. Eine Hemmung der PCR-Reaktion kann durch Amplifikation der internen Kontrolle ausgeschlossen werden.

Wenn im Fall eines ungelösten Ergebnisses (UNR) bei einer negativen Probe das Signal der internen Kontrolle ausbleibt, wird die Wiederholung des Tests empfohlen. Verdünnen Sie hierzu die Probe im Verhältnis 1:10, um zu prüfen, ob mögliche Inhibitionsprobleme vorliegen.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.



10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Krankengeschichte, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für in VTM entnommene nasopharyngeale/ oropharyngeale Abstriche validiert.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Es kann eine extrem niedrige Kopienzahl der Zielform unterhalb des Nachweisgrenzwerts nachgewiesen werden, wobei sich die Ergebnisse unter Umständen nicht wiederholen lassen.
- Es besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit SARS-CoV-2-verdächtigen Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-RNA enthalten, oder aufgrund einer Kontamination durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die spezifische Primer-Sonden-Kombination, die in dem zur Erkennung von SARS-CoV-2 ausgelegten VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit zum Nachweis des *S*-Gens eingesetzt wird, zeigt keine signifikanten kombinierten Homologien mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora, SARS-CoV oder anderen Coronaviren, die zu vorhersagbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch mehrere Faktoren und deren Kombinationen ergeben, darunter:
 - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder Handhabung von Proben.
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion).
 - Abbau der viralen RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben.
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-Varianten beeinträchtigen können.
 - eine Viruslast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Assays liegt.
 - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen. Der Einfluss von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, die zur Prävention von COVID-19 oder zur Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurde nicht untersucht.
 - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Die optimalen Probenarten sowie der Zeitpunkt während der durch SARS-CoV-2 verursachten Infektion, zu dem virale Spitzenwerte auftreten, wurden nicht bestimmt. Zum Nachweis des Virus kann die Entnahme mehrerer Proben (unterschiedlich nach Art und Zeitpunkt) desselben Patienten erforderlich sein.
- Wenn diagnostische Tests auf andere Atemwegserkrankungen negativ sind und das klinische Erscheinungsbild des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine Infektion mit SARS-CoV-2 möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
- Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2-Virus-RNA in einer klinischen Probe nicht aus. Wenn klinische Befunde, die Anamnese des Patienten und epidemiologische Informationen auf eine



COVID-19-Infektion hindeuten, sollte ein erneuter Test mit einem höheren Probenvolumen in Betracht gezogen werden.

- Bei Vorliegen ungelöster (UNR), nicht bestimmbarer (IND) oder unvollständiger (INC) Ergebnisse bei Verwendung des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kits ist eine Testwiederholung erforderlich. Ungelöste Ergebnisse können aufgrund von Hemmsubstanzen in der Probe oder einer inkorrekten Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

In jedem Reaktionsgefäß des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kits ist eine interne Kontrolle (IK) enthalten, mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kits wurde getestet unter Verwendung von 4 Nukleinsäuren, die aus in VTM entnommenen positiven nasopharyngealen und/oder oropharyngealen Abstrichen sowie aus 15 Atemwegsabstrichen (nasopharyngeale und/oder oropharyngeale Abstriche in VTM) von Patienten mit Verdacht auf COVID-19 oder andere ähnliche Atemwegserkrankungen isoliert wurden. Es wurden 4 SARS-CoV-2-positive Proben gefunden, und dieses Ergebnis stimmte mit einem PCR-Test überein, der anhand der Primer und Sonden des chinesischen CDC für den Nachweis von 2019-CoV entwickelt worden war.

Des Weiteren wurden die 4 SARS-CoV-2-positiven Proben bestätigt mithilfe einer molekularen Nachweismethode des nationalen Referenzentrums Spaniens (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Protokoll „2019-nCoV by real-time RT-PCR“, vorgeschlagen von der Charité (Berlin), mit Modifikationen).

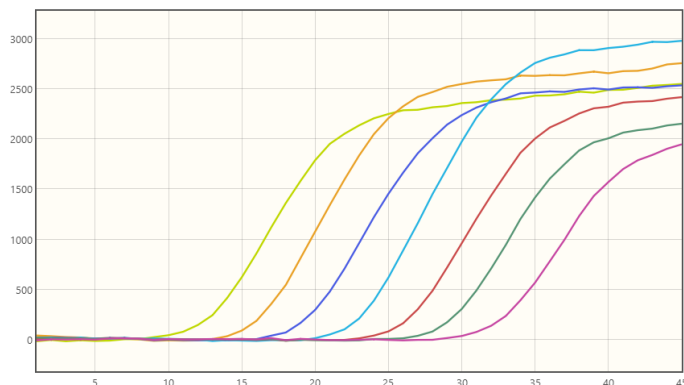
Zusammengefasst belegen die Ergebnisse eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von SARS-CoV-2 mithilfe des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kits.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenze des VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kits liegt bei ≥ 24 cDNA-Kopien pro Reaktion (cp/rxn) mit einem Anteil positiver Ergebnisse von ≥ 95 %.



Abbildung 2. Verdünnungsreihe des SARS-CoV-2 S gene ($2,4 \cdot 10^7$ - $2,4 \cdot 10^1$ cp/rxn), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des SARS-CoV-2 S gene Assays wurde durch Testen eines Panels mit verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen, bestätigt. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen konnte eine Kreuzreaktivität festgestellt werden:

Test auf Kreuzreaktionen					
Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-ähnliches Virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Humanes 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	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Schweiz/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> Genotyp A und 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	-	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4	-
Humanes Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-Virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Typ A1 und g885652	-
MERS-Coronavirus	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-ähnliches Virus	-	Humanes Rhinovirus Typ C	-
SARS Coronavirus Stamm 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>	-	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV) A und B	-

Tabelle 6. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.



12.4. Analytische Reaktivität







Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit wurde überprüft anhand von RNA des humanen 2019-nCoV-Stammes BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, des humanen 2019-nCoV-Stammes 2019-nCoV/Italy-INMI1 sowie von synthetischen RNA-Kontrollen für zwei Varianten des SARS-CoV-2-Virus, MT007544.1 (SARS-CoV2-Isolat Australia/VIC01/2020) und MN908947.3 (SARS-CoV-2-Isolat Wuhan-Hu-1), wobei positive Ergebnisse erhalten wurden.

13. Bibliography/Literatur

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.106/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. Dezember 2019. Verfügbar unter <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Zugriff im März 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. Health Ministry. Spanish Government. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Aktualisiert am 27.02.2020. Verfügbar unter https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Zugriff im März 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. Verfügbar unter <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Zugriff im März 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance.17. Januar 2020. Verfügbar unter <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Zugriff im März 2020.
10. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Verfügbar unter <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Zugriff im März 2020.
11. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Interim guidance. 27. Februar 2020. Verfügbar unter [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)). Zugriff im März 2020.



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

IVD	<p><i>In vitro</i> diagnostic device <i>In-vitro</i>-Diagnostikum</p>		<p>Keep dry Trocken aufbewahren</p>		<p>Use by Verfallsdatum</p>		<p>Manufacturer Hersteller</p>	LOT	<p>Batch code (Lot) Chargennummer</p>
	<p>Consult Instructions for Use Siehe Gebrauchsanweisung</p>		<p>Temperature limitation Temperaturbegrenzung</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)</p>	DIL	<p>Sample diluent Probenverdünnner</p>	REF	<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