

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Manuel pour les références suivantes:

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System
à utiliser avec le système BD MAX™



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.

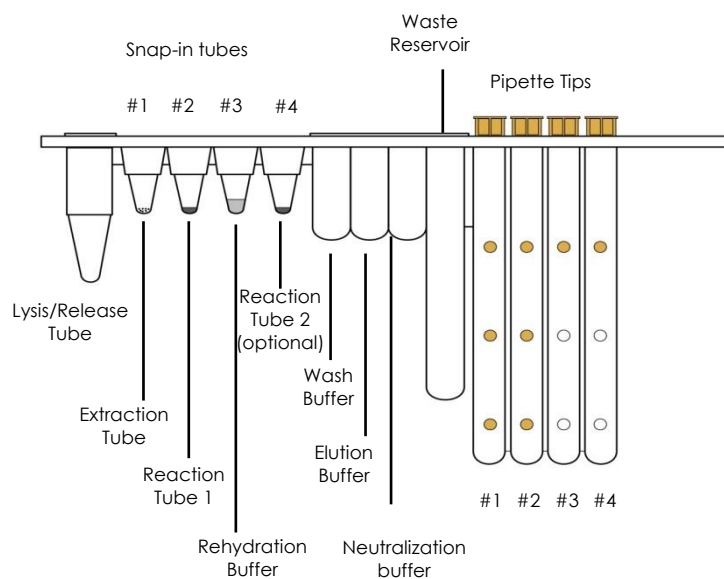
- 11) Click the "Save Test" button.

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

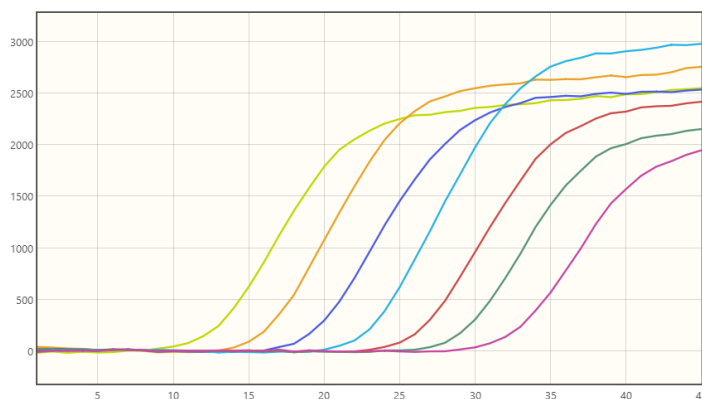
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit est conçu pour l'identification et la différenciation spécifiques du nouveau coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) dans les échantillons respiratoires de patients présentant des signes et symptômes d'infection au COVID-19. Ce test est destiné à faciliter l'identification dans le diagnostic du COVID-19 en combinaison avec les signes cliniques et symptômes du patient et les facteurs de risque épidémiologiques. Le test utilise le système BD MAX™ pour l'extraction automatisée de l'ARN, puis la méthode PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés avec des réactifs universels et consommables pour le système BD MAX™. L'ARN des échantillons respiratoires est détecté au moyen de sondes avec colorants/marqueurs fluorescents spécifiques pour le SARS-CoV-2.

2. Résumé et explication

Les coronavirus sont des virus enveloppés dont le génome est une molécule d'ARN de polarité positive non segmentée. Ils appartiennent à la famille des *Coronaviridae* [1,2]. Six espèces de coronavirus sont connues pour causer des maladies chez l'homme [2]. Quatre virus (229E, OC43, NL63 et HKU1) provoquent des symptômes de rhume courants et les deux autres [coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)] sont zoonotiques et entraînent des complications plus graves [2]. SARS-CoV et MERS-CoV ont causé plus de 10000 cas cumulés ces vingt dernières années, avec des taux de mortalité de 34 % pour MERS-CoV et de 10 % pour SARS-CoV [1,3].

En décembre 2019, des personnes qui travaillaient au marché de poissons de Huanan à Wuhan, province de Hubei, en Chine, ou qui habitaient à proximité, ont contracté une pneumonie d'origine inconnue [2,4]. Une analyse approfondie du séquençage des échantillons respiratoires a révélé un nouveau coronavirus, appelé dans un premier temps le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV), puis SARS-CoV-2 [5].

La transmission d'homme à homme du SARS-CoV-2 a été confirmée, même pendant la période d'incubation sans symptômes. Le virus provoque des pathologies respiratoires graves comme dans le cas du SARS-CoV [1,6,7]. Bien que la pneumonie constitue la principale maladie associée, quelques patients ont développé une forme de pneumonie plus grave, un œdème pulmonaire, le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou une défaillance multiviscérale et sont décédés [1,4]. Selon les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention ou CDC), les symptômes du SARS-CoV-2 peuvent se manifester dans les 2 jours et jusqu'à 14 jours après l'exposition, et sont, pour les plus fréquents : fièvre, toux, myalgie et dyspnée [1,4,8], et pour les moins fréquents : mal de gorge, maux de tête, diarrhée et vomissements [1,4]. Les sujets masculins présentant une comorbidité auraient été les plus affectés [4].

Le diagnostic du SARS-CoV-2 est réalisé par la détection des causes classiques de la pneumonie de manière précoce et par des méthodes de séquençage nouvelle génération ou RT-PCR en temps réel [1,9]. Plusieurs tests de dépistage du SARS-CoV-2 sont actuellement disponibles et répertoriés sur le site de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].



L'OMS recommande d'utiliser des échantillons provenant des voies respiratoires supérieures (écouvillons nasopharyngés et oropharyngés) et/ou des voies respiratoires inférieures (expectorations, aspirat endotrachéal ou fluides de lavage bronchoalvéolaire) pour l'identification du SARS-CoV-2 [9,11]. Par ailleurs, d'autres échantillons cliniques (sang, urine et selles) peuvent être prélevés pour surveiller la présence du virus [9,11].

3. Procédé

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit est conçu pour l'identification du SARS-CoV-2 dans des échantillons respiratoires. La détection se fait en une seule étape par RT-PCR en temps réel au cours de laquelle la transcription inverse et l'amplification ultérieure de la séquence cible spécifique se produisent dans le même puits à réaction. La cible ARN isolée est transcrite, générant de l'ADN complémentaire par transcriptase inverse qui est suivie par l'amplification d'une zone conservée du gène *S* au moyen d'amorces spécifiques et d'une sonde marquée d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le système BD MAX™.

Le VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon, polymérase) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne pour écarter l'inhibition de l'activité polymérase. Le SARS-CoV-2 est amplifié et détecté dans le canal 475/520 et le contrôle interne (CI) dans le canal 530/565.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 1 ci-après.

Référence	Réactif/matériau	Description	Couleur	Quantité
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne dans un format stabilisé	Opercule vert transparent	2 poches de 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule orange transparent	1 poche de 24 tubes

Tableau 1. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit, réf. VS-NCO124 (444212).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement nécessaires, mais non inclus dans le VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.



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

6. Conditions de transport et de stockage

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

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le système BD MAX™ ne sont pas contaminés. Évitez à tout moment tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches.



- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, boire ou fumer dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et matériau ayant été exposé à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le stockage, le traitement et l'élimination des échantillons.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Consultez le manuel de l'utilisation du système BD MAX™ pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.

8. Protocole de test

8.1. PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Le VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit a été validé sur un écouvillon nasopharyngé/oropharyngé négatif prélevé dans un milieu de transport viral (VTM) (Vircell S.L., Espagne) et l'acide nucléique isolé à partir d'un écouvillon nasopharyngé/oropharyngé positif prélevé dans un VTM.

D'autres types d'échantillons différents provenant d'écouvillons nasopharyngés/oropharyngés dans un VTM doivent être validés par l'utilisateur.

Les échantillons prélevés, stockés et transportés doivent être conservés selon les conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 48 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 48 heures), nous recommandons une expédition à ≤ -20 °C. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 48 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.



8.2. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET EXTRACTION DE L'ARN

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

1. Pipettez entre 200 et 750 µl de l'écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un milieu de transport viral (VTM) dans un BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le système BD MAX™.

8.3. PROTOCOLE PCR

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

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

Remarque: si vous avez déjà créé le test VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran «Run» (Exécuter) du système BD MAX™, sélectionnez l'onglet «Test Editor» (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche «Create» (Créer).
- 3) Dans la fenêtre «Test Name» (Nom du test), attribuez un nom à votre test: notamment, VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) Dans le menu déroulant «Extraction Type» (Type d'extraction), sélectionnez «ExK TNA-3».
- 5) Dans le menu déroulant «Master Mix Format» (Format Master Mix), sélectionnez «Type 5».
 - b. Remarque: l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX, dans ce cas sélectionnez «Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)» (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et réglez le volume de l'échantillon selon le volume de l'échantillon clinique utilisé, plus 500 µL.
 - a. Exemple : Pour une pipette de 200 µL d'échantillon respiratoire clinique dans un BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, réglez le paramètre sur 700 µL.
 - b. Remarque : le réglage maximal est 950 µL.
- 7) Dans le «Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez «Call Ct at Threshold Crossing» (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Sous l'onglet «PCR settings» (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants: «Channel Settings» (Réglages des canaux), «Gains» et «Threshold» (Seuil) (tableau 2).



- a. Remarque: l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX, les Réglages PCR et les Étapes du test doivent être effectués pour les clips positions 2 (vert) et 4 (bleu).

Channel (Canal)	Alias (Pseudo)	Gain	Threshold (Seuil)	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	CI	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

Tableau 2. Réglages PCR.

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

- 9) Sous l'onglet «PCR settings» (Réglages PCR), saisissez également les paramètres «Spectral Cross Talk» (tableau 3) suivants:

		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0

Tableau 3. Paramètres crosstalk spectraux.

- 10) Sous l'onglet «Test Steps» (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 4).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles	Time (s) (Temps (s))	Temperature (Température)	Detect (Détection)
Transcription inverse	Maintien	1	900	45°C	-
Dénaturation initiale	Maintien	1	120	98°C	-
Dénaturation et appariement/extension (collecte de données)	2-température	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tableau 4. Protocole PCR.

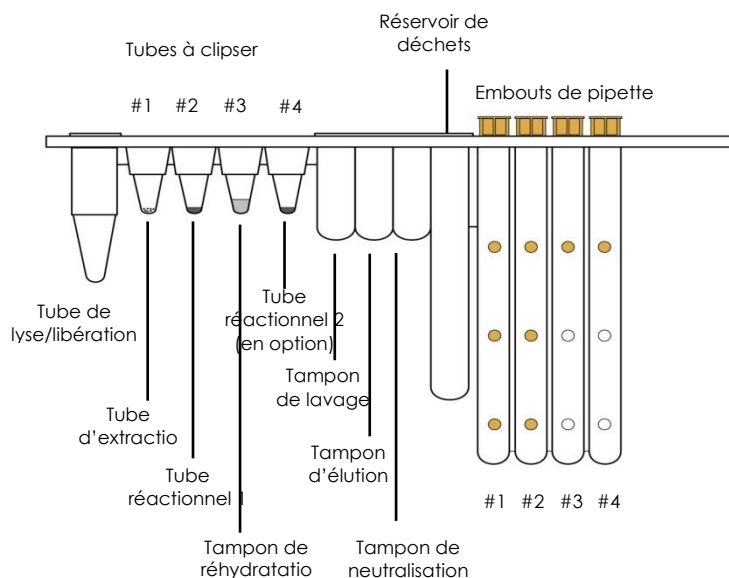
- 11) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).



8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- 1) Prenez une barrette unitaire de réactifs du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit (BD MAX™ ExK TNA-3 Reagent Strip (TNA)) pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond du tube et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du système BD MAX™.
- 2) Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- 3) Déterminez et séparez le nombre approprié de VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (opercule vert) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir- voir figure 1).
 - a. Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - b. Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage.
 - i. Remarque: si vous choisissez le format «Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)» (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation)(section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels VIASURE supplémentaires (opercule différent) et clipsez-les dans les positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer tube (opercule orange) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
 - a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage.

Figure 1. BD MAX™ TNA barrette réactive (TNA) du kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet «Work List » (Liste de travail) sur l'écran «Run» (Exécuter) du système BD MAX™ (logiciel v4.50A ou supérieur).
- 2) Dans le menu déroulant «Test», sélectionnez VIASURE SARS-CoV-2 S gene (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification/ le code barre du tube de tampon d'échantillon BD MAX™ ExK TNA-3 dans la fenêtre « Sample tube » (Tube à Échantillon) de l'onglet « Work list » (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou « Accession » l'onglet «Work List » (Liste de travail) et cliquez sur la touche «Save» (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les Sample Buffer Tubes soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les Sample Buffer Tubes sont correctement appariés.
- 6) Placez le tube de tampon d'échantillon préparé dans le(s) portoir(s) du système BD MAX™.
- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™ (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument BD MAX™ et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de BD MAX™ PCR Cartridge(s) dans le système BD MAX™.
- 9) Fermez la porte du système BD MAX™.
- 10) Cliquez sur «Start Run» (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.4. Rapport BD MAX™

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

9. Interprétation des résultats

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

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



- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 2). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 5.

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

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

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Contrôle interne (530/565)	Interprétation
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA non détecté
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA détecté
-	-	Résultat non résolu (UNR, Unresolve result) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu avec le traitement de l'échantillon et/ou les étapes d'amplification.
IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 5. Interprétation de l'échantillon

+ : l'amplification a eu lieu

- : l'amplification n'a pas eu lieu

Un échantillon est considéré positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne peut afficher ou non un signal d'amplification parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible au lieu du contrôle interne. Dans ce cas, la détection du CI n'est pas nécessaire.

Un échantillon est considéré négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection et si le contrôle interne est positif. L'inhibition de la réaction polymérase peut être exclue par l'amplification du contrôle interne.



En cas de résultats non résolus (UNR, unresolved result), d'absence de signal du contrôle interne dans un échantillon négatif, il est recommandé de recommencer le test en diluant l'échantillon au 1/10 pour vérifier les éventuels problèmes d'inhibition.

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

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec un écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un VTM.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons respiratoires.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par des échantillons suspects de SARS-CoV-2 contenant de fortes concentrations de l'ARN cible ou à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- La combinaison spécifique d'amorce et de sonde pour la détection du gène S utilisée dans le VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, conçu pour la détection du SARS-CoV-2, ne présente pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine, le SARS-CoV ou autres coronavirus, susceptibles d'entraîner un résultat faux positif prévisible.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment:
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ARN).
 - La dégradation de l'ARN viral durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variantes nouvelles ou inconnues de SARS-CoV-2.
 - Une charge virale dans l'échantillon inférieure à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes. L'impact des vaccins, des thérapies antivirales, des antibiotiques, des chimiothérapies ou des médicaments immunosuppresseurs utilisés pour prévenir le COVID-19 ou utilisés pendant le traitement de l'infection n'a pas été évalué.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Les types d'échantillons et le moment optimaux pour les pics de concentration virale pendant les infections causées par le SARS-CoV-2 n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons (types et moments) sur un même patient peut s'avérer nécessaire pour détecter le virus.



- Si les tests de diagnostic d'autres maladies respiratoires sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent que l'infection par le SARS-CoV-2 est possible, il convient alors d'envisager un résultat faux négatif et de discuter d'un nouveau test pour le patient.
- Un résultat négatif n'exclut pas la présence de l'ARN du virus du SARS-CoV-2 dans un échantillon clinique. Si les observations cliniques, les antécédents du patient et les informations épidémiologiques suggèrent une infection par le COVID-19, il convient d'envisager un nouveau test en augmentant le volume de l'échantillon.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne (CI) qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit a été testée au moyen de 4 acides nucléiques isolés à partir d'écouvillons nasopharyngés et/ou oropharyngés positifs prélevés dans un VTM et 15 échantillons respiratoires (écouvillons nasopharyngés et/ou oropharyngés dans un VTM) de patients avec une suspicion clinique de la maladie COVID-19 ou autres maladies respiratoires similaires. Quatre échantillons se sont avérés positifs pour le SARS-CoV-2. Ces résultats étaient en adéquation avec un test PCR développé selon les amorces et les sondes du CDC chinois pour la détection du 2019-nCoV.

En outre, les quatre échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 ont été confirmés au moyen d'une méthode de détection moléculaire par le Centre national de référence espagnol [Institut de santé Carlos III (ISCIII)] [le protocole de détection « 2019-nCoV by real-time RT-PCR » suggéré par la Charité (Berlin), avec modifications].

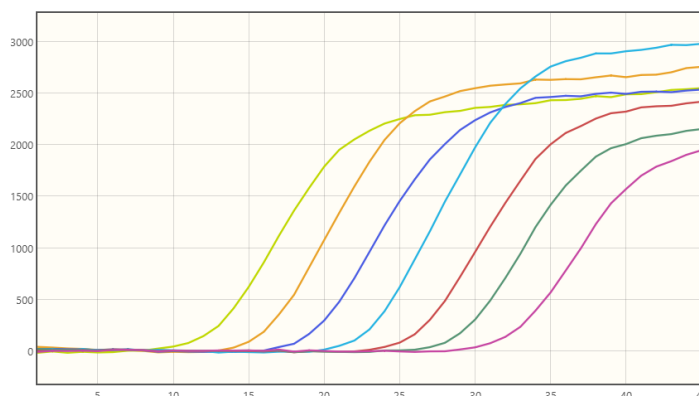
En conclusion, les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées pour la détection du SARS-CoV-2 avec le VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit a une limite de détection ≥ 24 copies d'ADNc par réaction (cp/rxn) avec un taux positif ≥ 95 %.



Figure 2. Dilution en série du gène SARS-CoV-2 S (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn), modèle réalisé sur le système BD MAX™ (canal 475/520 [FAM]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test ciblant la présence du SARS-CoV-2 S gene a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les agents pathogènes des voies respiratoires les plus courants. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants:

Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Virus de type influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Human Bocavirus	-	Virus influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Métapneumovirus humain A et B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Génotype <i>Chlamydia psittaci</i> A et C	-	Virus influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Virus influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
Coronavirus humain 229E, OC43, NL63 et HKU1	-	Virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> type A1 et g885652	-
Coronavirus MERS	-	Virus de type influenza B/Brisbane/60/2008	-	Rhinovirus humain type C	-
Coronavirus SARS souche Francfort 1	-	Virus influenza B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus respiratoire syncytial (RSV) A et B	-

Tableau 6. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique

La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit a été évaluée par rapport à l'ARN d'une souche de 2019-nCoV humaine BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, d'une souche de 2019-nCoV humaine 2019-









nCoV/Italy-INMI1, des contrôles par ARN synthétique pour deux variantes du virus SARS-CoV-2 : MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) et MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), montrant un résultat positif.

13. Bibliography/Bibliographie

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoA2001017.
3. Organisation mondiale de la santé. Mise à jour de la situation pour MERS. Décembre 2019 Disponible sur <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Accès mars 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. Ministère de la santé. Gouvernement espagnol. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Mise à jour le 27/02/2020. Disponible sur https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Accès mars 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. Disponible sur <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Accès mars 2020.
9. Organisation mondiale de la santé. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 janvier 2020. Disponible sur <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Accès mars 2020.
10. Organisation mondiale de la santé. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Disponible sur <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Accès mars 2020.
11. Organisation mondiale de la santé. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Lignes directrices provisoires. 27 février 2020 Disponible sur [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)). Accès mars 2020.



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

IVD	<p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry Conserver dans un endroit sec</p>		<p>Use by Utiliser avant</p>		<p>Manufacturer Fabricant</p>	LOT	<p>Batch code (Lot) Numéro de lot</p>
	<p>Consult Instructions for Use Consulter les consignes d'utilisation</p>		<p>Temperature limitation Limitation de température</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)</p>	DIL	<p>Sample diluent Diluant d'échantillon</p>	REF	<p>Catalognumber Numéro de catalogue</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