

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Manuale per i seguenti riferimenti:

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

da utilizzare con il sistema 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				
		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.

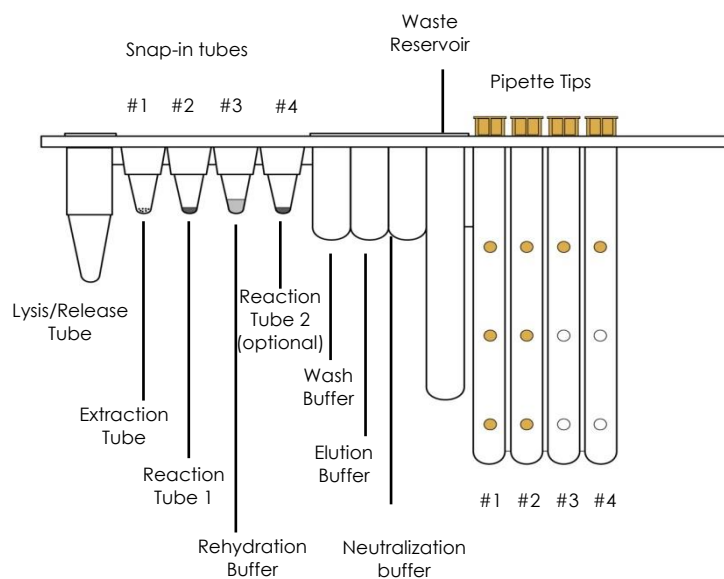
- 11) Click the "Save Test" button.

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

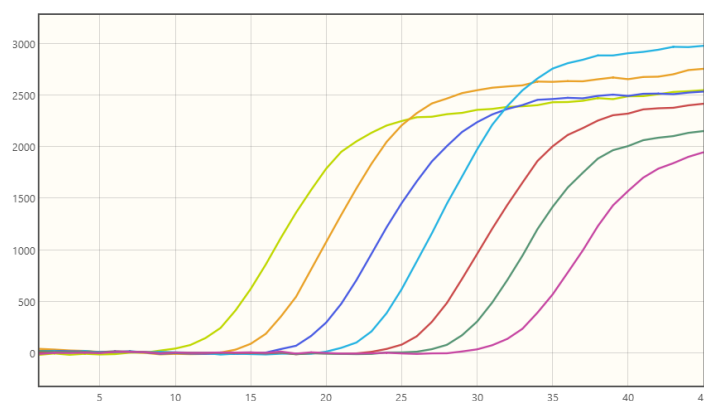
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



ITALIANO

1. Uso previsto

Il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit è progettato per l'identificazione specifica e la differenziazione del nuovo Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) su campioni respiratori da pazienti con segni e sintomi dell'infezione da COVID-19. L'uso previsto di questo test è quello di facilitare l'identificazione durante la diagnosi del COVID-19 in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e i fattori di rischio epidemiologico. Questo test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione automatica dell'RNA e successivamente del PCR in tempo reale, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e monouso del sistema BD MAX™. L'RNA viene estratto da campioni respiratori utilizzando sonde marcate da un colorante fluorescente specifico per il SARS-CoV-2.

2. Introduzione e spiegazione

I Coronavirus sono virus a RNA non segmentato a senso positivo dotati di pericapside che appartengono alla famiglia dei *Coronaviridae* [1,2]. Esistono sei specie di coronavirus noti per causare malattie nell'uomo [2]. Quattro virus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causano i sintomi della comune influenza e altri due (sindrome respiratoria acuta grave da Coronavirus (SARS-CoV) e sindrome respiratoria mediorientale da Coronavirus (MERS-CoV)) sono zoonotici e causano complicanze più gravi [2]. Il SARS-CoV e il MERS-CoV hanno causato oltre 10.000 casi cumulativi negli ultimi due decenni, con un tasso di mortalità del 34% per il MERS-CoV e del 10% per il SARS-CoV [1,3].

Nel dicembre 2019, alcune persone che lavoravano o vivevano nella zona intorno al mercato del pesce Huanan di Wuhan, nella provincia di Hubei, in Cina, hanno riportato una polmonite di origine sconosciuta [2,4]. Le accurate analisi di sequenziamento dei campioni respiratori indicavano un nuovo coronavirus, denominato inizialmente nuovo Coronavirus 2019 (2019-nCoV) e successivamente SARS-CoV-2 [5].

È stato dimostrato che il SARS-CoV-2 è trasmissibile da uomo a uomo, anche durante il periodo di incubazione in cui non si manifestano i sintomi, e che causa una malattia respiratoria grave simile a quelle prodotte dal SARS-CoV [1,6,7]. Nonostante la polmonite sia la principale malattia associata, alcuni pazienti hanno sviluppato polmonite grave, edema polmonare, sindrome da distress respiratorio acuto, insufficienza multiorganica e morte [1,4]. I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (CDC) ritengono che i sintomi del SARS-CoV-2 compaiano tra i 2 e i 14 giorni dopo l'esposizione, con febbre, tosse, mialgia e dispnea tra i sintomi più comuni [1,4,8]. Sintomi meno comuni sono infiammazione della gola, cefalea, diarrea e vomito [1,4]. Si ritiene che vengano maggiormente colpiti i maschi anziani con comorbidità [4].

La diagnosi di SARS-CoV-2 viene effettuata riconoscendo in anticipo le tradizionali cause di polmonite e viene eseguita attraverso un sequenziamento di nuova generazione o i metodi di RT-PCR in tempo reale [1,9]. I diversi campioni attualmente disponibili per rilevare il SARS-CoV-2 sono elencati sul sito web della WHO (*World Health Organization*, Organizzazione mondiale della sanità (OMS)) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

Per l'identificazione del SARS-CoV-2, l'OMS raccomanda campioni delle vie respiratorie superiori (tamponi nasofaringeo e orofaringeo) e/o delle vie inferiori (espettorato, aspirato endotracheale o lavaggio



broncoalveolare) [9,11]. Per monitorare la presenza del virus, possono anche essere raccolti campioni chimici come sangue, urine e feci [9,11].

3. Principi del procedimento

Il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit è progettato per l'identificazione del SARS-CoV-2 su campioni respiratori. Il rilevamento si esegue con un test di RT-PCR in tempo reale in un solo passaggio, in cui la trascrizione e la successiva amplificazione della specifica sequenza target avvengono durante la stessa reazione. L'RNA target isolato viene quindi trascritto, generando un DNA complementare tramite la trascrittasi inversa, seguita dall'amplificazione di una regione conservata del gene *S* utilizzando primer specifici e una sonda marcata a fluorescenza.

Il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. Questa fluorescenza può essere misurata sul sistema BD MAX™.

Il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un campione di PCR in tempo reale (sonde/primer specifici, dNTPS, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato e un controllo interno per monitorare l'inibizione della PCR. Il SARS-CoV-2 viene amplificato e individuato nel canale 475/520, mentre il controllo interno (CI) nel canale 530/565.

4. Reagenti forniti

Il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 1:

Riferimento	Reagente/Materiale	Descrizione	Colore	Quantità
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno in un formato stabilizzato	Sigillo verde trasparente	2 confezioni da 12 provette
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo arancione trasparente	1 confezione da 24 provette

Tabella 1. Reagenti e materiali forniti nel VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit con Cod. VS-NCO124 (444212).

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

- Strumenti per la PCR in tempo reale: Sistema BD MAX™.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod: 437519).
- Vortex.



- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo la loro apertura, le confezioni che contengono le provette di reazione possono essere utilizzate fino a un massimo di 28 giorni.

7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti e tecnici di laboratorio o sanitari, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare in ogni momento la contaminazione dei reagenti con microrganismi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce.
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della PCR BD MAX™ Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Disegnare un flusso unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere o fumare all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.



- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, la conservazione, il trattamento e lo smaltimento dei campioni.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

8. Procedura del test

8.1. RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit è stato convalidato su un tampone nasofaringeo/orofaringeo negativo collocato in un mezzo di trasporto virale (VTM) (Vircell S.L., Spain) e su acidi nucleici isolati da un tampone nasofaringeo/orofaringeo positivo collocato in un VTM.

Diverse tipologie di campioni da tamponi nasofaringei/orofaringei in un VTM devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i tamponi respiratori devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) ed esaminati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 48 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 48 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤ -20 °C. È consigliato utilizzare campioni appena raccolti per il test. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C a 48 ore oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

8.2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE ED ESTRAZIONE DELL'RNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

1. Pipettare tra 200 e 750 μ l di campione nasofaringeo/orofaringeo raccolto in un mezzo di trasporto virale (VTM) in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

8.3. PROTOCOLLO PCR

Nota: Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per istruzioni dettagliate.



8.3.1. Creare il programma di test di PCR per il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

Nota: Se avete già creato il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection test, potete saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" (Esegui) del sistema BD MAX™, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il vostro test: es. VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
 - b. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Utente definito) e regolare il volume del campione in base al volume del campione clinico usato aggiungendo 500 µl.
 - a. Esempio: se si pipetta 200 µl di un campione clinico respiratorio in BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, impostare il parametro su 700 µl.
 - b. Nota: l'impostazione massima è di 950 µl.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 2).
 - a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni 2 (verde) e 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	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

Tabella 2. Impostazioni di PCR.

Nota: si consiglia di impostare i valori minimi della soglia sopraelencati per ciascun canale come punto di partenza; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.



- 9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 3):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)				
Channel (Canale)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	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	-

Tabella 3. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

- 10) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 4).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time(s) (Tempo)	Temperature (Temperatura)	Defect (Rilevazione)
Trascrizione inversa	Hold (Attendere)	1	900	45°C	-
Denaturazione iniziale	Hold (Attendere)	1	120	98°C	-
Denaturazione e allineamento/Estensione (Raccolta dati)	2- Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabella 4. Protocollo PCR.

- 11) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

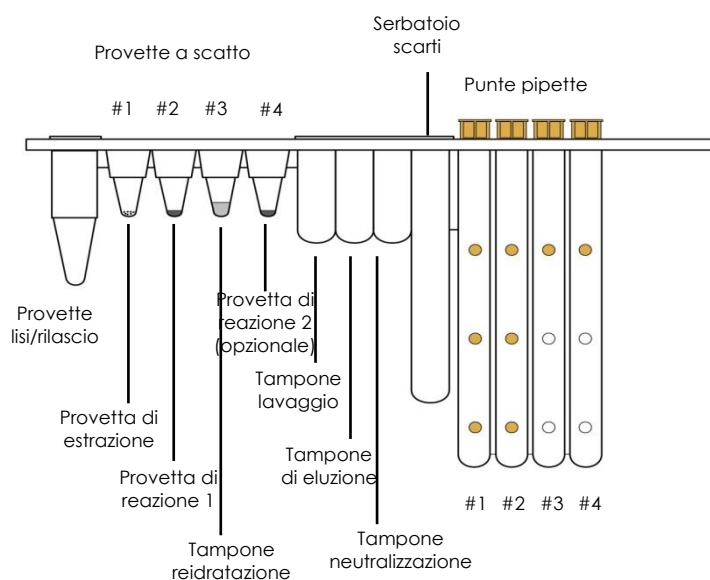
8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- Per ogni campione da testare, rimuovere una striscia di reagente individuale dal BD MAX™ ExK TNA-3 Kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo della provetta, quindi posizionarle sulla griglia del sistema BD MAX™.
- Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK TNA (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- Determinare e separare il numero appropriato di VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (sigillo verde) e posizionarli nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.



- i. Nota: Se scegliete il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tubes (sigillo arancione) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica.

Figura 1. Striscia di reagente BD MAX™ TNA (TNA) dal BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software del sistema BD MAX™ nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE SARS-CoV-2 S gene (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della provetta di campione nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Worklist" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice campione/paziente e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Worklist" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le provette di



tampone campione. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le provette di tampone campione corrispondano.

- 6) Posizionare la provetta di tampone campione preparata sulla griglia del BD MAX™.
- 7) Caricare la griglia sul sistema BD MAX™ (la griglia A si trova sul lato sinistro del sistema BD MAX™, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto BD MAX™ PCR Cartridge(s) nel sistema BD MAX™.
- 9) Chiudere la porta del sistema BD MAX™.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report)

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del sistema BD MAX™.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 2). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 5.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al sistema BD MAX™.

-I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:



SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Controllo interno (530/565)	Interpretazione
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA Non rilevato
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Rilevato
-	-	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.
IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 5. Interpretazione del campione

+: Curva di amplificazione presente

-: Senza curva di amplificazione

Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il controllo interno a volte può non mostrare un segnale di amplificazione a causa di un elevato numero di copie del bersaglio, che causa un'amplificazione preferenziale degli acidi nucleici specifici al posto del controllo interno. In questi casi, non è necessario il rilevamento del CI.

Un campione viene considerato negativo se non mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rilevamento ma il controllo interno è positivo. Un'inibizione della reazione di PCR può essere esclusa dall'amplificazione del controllo interno.

In caso di risultati non risolti (UNR) con assenza di un segnale di controllo interno in un campione negativo, è raccomandabile ripetere il test diluendo il campione 1:10 per rilevare eventuali problemi di inibizione.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi nasofaringei/orofaringei raccolti in un VTM.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni respiratori.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.



- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione incrociata con campioni con sospetto SARS-CoV-2, a causa di concentrazioni elevate di RNA bersaglio oppure di contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- La combinazione dei primer e delle sonde specifiche per l'identificazione del gene *S* usata nel VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit progettato per il rilevamento del SARS-CoV-2 non mostra omologie combinate significative con il genoma umano, la microflora umana, il SARS-CoV o altri coronavirus, rendendo prevedibili i falsi positivi.
- I risultati falsi negativi possono arrivare da numerosi fattori e dalle combinazioni di tali fattori, inclusi:
 - Prelievo, trasporto, conservazione e/o metodi di manipolazione dei campioni incorretti.
 - Procedure di elaborazione incorrette (inclusa l'estrazione dell'RNA).
 - Degradazione dell'RNA virale durante la spedizione/conservazione e/o l'elaborazione.
 - Le mutazioni o i polimorfismi delle regioni di legame dei primer o delle sonde possono influenzare il rilevamento di nuove o sconosciute varianti del SARS-CoV-2.
 - Carica virale del campione inferiore al limite di rilevamento del dosaggio.
 - Presenza di inibitori dell'RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenze. L'impatto di vaccini, farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o farmaci immunosoppressori utilizzati per prevenire il COVID-19 o utilizzati durante il trattamento dell'infezione non è stato valutato.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- I risultati negativi non escludono un'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardante la gestione del paziente. Non sono stati definiti i tipi di campioni ottimali e il periodo ottimale dei livelli virali picco durante le infezioni causate dal SARS-CoV-2. Per rilevare il virus può essere necessario prelevare più campioni (tipi e periodo di campionamento) nello stesso paziente.
- Se i test diagnostici per altre patologie respiratorie sono negativi e la presentazione clinica e le informazioni epidemiologiche del paziente indicano la possibilità di un'infezione da SARS-CoV-2, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e discutere la ripetizione del test.
- Un risultato negativo non esclude la presenza dell'RNA virale del SARS-CoV-2 in un campione clinico. Se le affermazioni cliniche, l'anamnesi e le informazioni epidemiologiche del paziente suggeriscono un'infezione da COVID-19, è necessario prendere in considerazione la ripetizione del test aumentando il volume dei campioni.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o ad una reidratazione incorretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

Il VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contiene un controllo interno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica.



12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

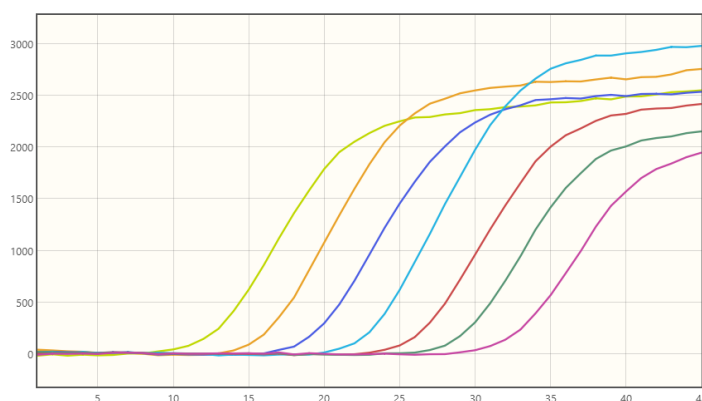
La prestazione clinica del VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit è stata testata utilizzando 4 acidi nucleici isolati da tamponi nasofaringei e/od orofaringei positivi collocati in un VTM e 15 campioni respiratori (tamponi nasofaringei/orofaringei in un VTM) da pazienti con sospetto clinico della malattia da COVID-19 o altre malattie respiratorie simili. Sono stati trovati 4 campioni positivi al SARS-CoV-2 e questi risultati erano conformi a un test di PCR sviluppato sulla base dei primer e delle sonde del CDC della Cina per il rilevamento del 2019-nCoV. Inoltre, i 4 campioni positivi al SARS-CoV-2 sono stati confermati utilizzando un metodo di rilevamento molecolare del centro di riferimento nazionale spagnolo (Instituto de Salud Carlos III - ISCIII) (il protocollo "2019-nCoV by real-time RT-PCR" proposto da Charité, Berlino, con modifiche).

Concludendo, i risultati mostrano un'elevata sensibilità e specificità nella rilevazione del SARS-CoV-2 utilizzando il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilità analitica

Il VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit presenta un limite di rilevamento di ≥ 24 copie di cDNA per reazione (cp/rxn) con un tasso positivo $\geq 95\%$.

Figura 2. Serie di diluizioni del SARS-CoV-2 S gene ($2,4 \cdot 10^7$ - $2,4 \cdot 10^1$ cp/rxn) realizzata sul sistema BD MAX™ (canale 475/520 (FAM)).



12.3. Specificità analitica

La specificità del test SARS-CoV-2 S gene è stata confermata testando un pannello formato da diversi organismi che rappresentano i più comuni patogeni respiratori. Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata tra i seguenti microrganismi testati:



Test di reattività incrociata					
Adenovirus umano sierotipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Virus del tipo Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Bocavirus umano	-	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)	-	Metapneumovirus umano A e 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>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A e C	-	Virus Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4	-
Coronavirus umani 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipo A1 e g885652	-
Coronavirus MERS	-	Virus del tipo Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Rhinovirus umano di tipo C	-
SARS Coronavirus ceppo Frankfurt 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 respiratorio sinciziale (RSV) A e B	-

Tabella 6. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

12.4. Reattività analitica

La reattività del kit VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit è stata valutata utilizzando l'RNA derivato dal ceppo di 2019-nCoV umano BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, ceppo di 2019-nCoV umano 2019-nCoV/Italy-INMI1 e mediante controlli con RNA sintetico per due varianti del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (isolato SARS-CoV2 Australia/VIC01/2020) e MN908947.3 (isolato SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1) hanno mostrato risultato positivo.











13. Bibliography/Bibliografia

- 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.
- Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- Organizzazione mondiale della sanità. MERS situation update. Dicembre 2019. Disponibile su <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Ultimo accesso marzo 2020.
- 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.
- Ministero della salute. Governo spagnolo. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Aggiornato al 27/02/2020. Disponibile su https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Ultimo accesso marzo 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. Disponibile su <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Ultimo accesso marzo 2020.
9. Organizzazione mondiale della sanità. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance.17 gennaio 2020. Disponibile su <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Ultimo accesso marzo 2020.
10. Organizzazione mondiale della sanità. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Disponibile su <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Ultimo accesso marzo 2020.
11. Organizzazione mondiale della sanità. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Interim guidance. 27 febbraio 2020. Disponibile su [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)). Ultimo accesso marzo 2020.

14. Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti IVD

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Mantenere asciutto</p>	 <p>Use by Usare entro</p>	 <p>Manufacturer Produttore</p>	 <p>Batch code (Lot) Codice lotto</p>
 <p>Consult Instructions for Use Consultare le istruzioni per l'uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitazione temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contenuto sufficiente per <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluente</p>	 <p>Catalognumber Numero catalogo</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