

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/

Håndbok for følgende referanser/

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

for bruk med BD MAX™-systemet



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to *Coronaviridae* family [1,2]. There are six coronavirus species known to cause human diseases [2]. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications [2]. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV [1,3].

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause [2,4]. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2 [5].

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced [1,6,7]. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death [1,4]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever, cough, myalgia and dyspnea [1,4,8]. Less common symptoms are sore throat, headache, diarrhea and vomiting [1,4]. It seems that older males with comorbidities have been more affected [4].

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

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



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

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification of SARS-CoV-2 in respiratory samples. The detection is done in one step real time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of *S* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

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

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents at all times. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.



- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit has been validated on negative nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) (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.

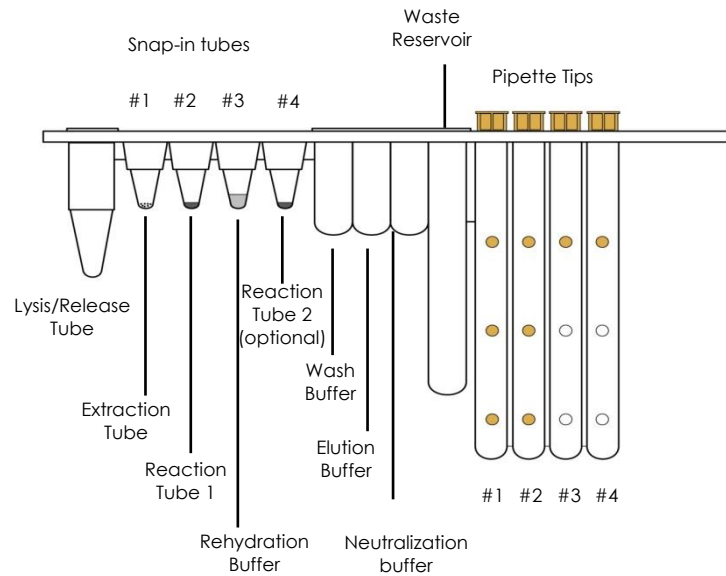
- 11) Click the "Save Test" button.

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

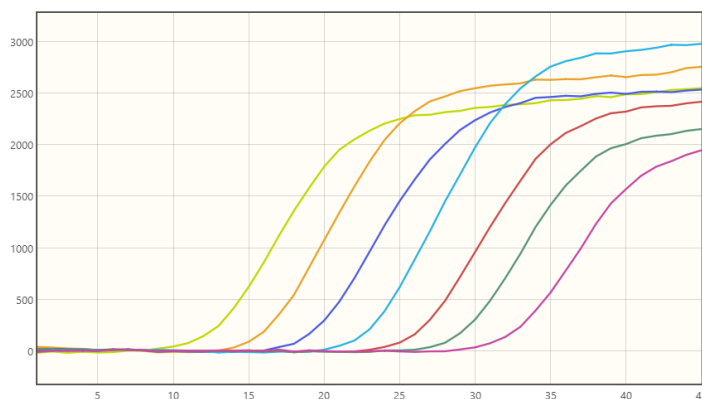
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



NORSK

1. Tiltentkt bruk

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit er designet for spesifikk identifikasjon og differensiering av 2019 nytt koronavirus (SARS-CoV-2) i luftveisprøver fra pasienter med tegn og symptomer på infeksjon med COVID-19. Denne testen er ment som en hjelp i identifikasjonen ved diagnostisering av COVID-19 i kombinasjon med pasientens kliniske tegn og symptomer samt epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av RNA og påfølgende sanntids RT-PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. RNA fra luftveisprøver påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for SARS-CoV-2.

2. Sammendrag og forklaring

Coronavirus er kappeklede, ikke-segmenterte RNA-virus med positiv polaritet og tilhører Coronaviridae-familien [1,2]. Man kjenner til seks typer coronavirus som forårsaker sykdom hos mennesker [2]. Fire av virusene (229E, OC43, NL63 og HKU1) gir vanlige forkjølelssymptomer, og de andre to (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) og Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) er zoonotiske og gir mer alvorlige komplikasjoner [2]. SARS-CoV og MERS-CoV har til sammen forårsaket mer enn 10 000 tilfeller i løpet av de siste to tiårene, med mortalitetsrater på 34 % for MERS-CoV og 10 % for SARS-CoV [1,3].

Flere personer som jobbet på eller bodde rundt Huanan sjømatmarked i Wuhan i den kinesiske provinsen Hubei fikk i desember 2019 pneumoni med ukjent årsak [2,4]. Dypsekvenseringsanalyse av luftveisprøvene indikerte et nytt coronavirus, som først ble kalt "2019 nytt coronavirus" (2019-nCoV) og i den senere tid SARS-CoV-2 [5].

Overføring av SARS-CoV-2 mellom mennesker har blitt bekreftet, til og med under den symptomfrie inkubasjonsperioden, og viruset gir alvorlig luftveissykdom i likhet med de SARS-CoV forårsaket [1,6,7]. Selv om pneumoni er den sykdommen som hovedsakelig forbindes med viruset, har noen få pasienter utviklet alvorlig pneumoni, lungeødem, akutt lungesviktsyndrom (ARDS) eller flerorgansvikt og død [1,4]. Sentre for sykdomskontroll og forebygging (CDC) tror at symptomene på SARS-CoV-2 kan opptre etter så lite som 2 dager eller så lenge som 14 dager etter eksponering, der de vanligste symptomene er feber, hoste, myalgi og dyspné [1,4,8]. Mindre vanlige symptomer er sår hals, hodepine, diaré og oppkast [1,4]. Det ser ut til at eldre menn med komorbiditeter har blitt rammet i større grad [4].

Diagnostisering av SARS-CoV-2 gjøres ved tidlig påvisning av konvensjonelle årsaker til pneumoni og påvisning via nestegenerasjons sekvensering eller sanntids RT-PCR-metoder [1,9]. Flere analyser for påvisning av SARS-CoV-2 er tilgjengelige på nåværende tidspunkt, og disse er listet opp på nettstedet til WHO (Verdens helseorganisasjon) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO anbefaler at det tas prøver fra de øvre luftveier (nasofaryngeale og orofaryngeale prøvepensler) og/eller de nedre luftveier (sputum, endotrakealt aspirat eller bronkoalveolær lavage (BAL)) for identifikasjon av SARS-CoV-2 [9,11]. I tillegg kan det innsamles andre kliniske prøver, som blod, urin og avføring, for å monitorere tilstedeværelse av viruset [9,11].



3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit er designet for identifikasjon av SARS-CoV-2 i luftveisprøver. Påvisningen utføres i ettrinn, sanntids RT-PCR-format, der revers transkripsjon og påfølgende amplifikasjon av den spesifikke målsekvensen skjer i samme reaksjonsbrønn. Det isolerte RNA-målet transkriberes og genererer komplementært DNA via revers transkriptase. Deretter amplifiseres et konservert område av *S*-genet ved hjelp av spesifikke primere og en fluorescensmerket probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sequensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av målmalen. Denne fluorescensen måles av BD MAX™-systemet.

Hvert rør i VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer og polymerase) i et stabilisert format, samt en intern kontroll til monitorering av PCR-hemming. SARS-CoV-2 amplifiseres og påvises i kanal 475/520 og den interne kontrollen (IC) i kanal 530/565.

4. Reagenser som følger med

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 1:

Referanse	Reagens/materiale	Beskrivelse	Farge	Mengde
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S gene</i> reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og intern kontroll i et stabilisert format	Transparent grønn folie	2 poser à 12 rør
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	Transparent oransje folie	1 pose à 24 rør

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

5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection kit.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Filterspisser
- Pudderfri engangshansker



6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan disse brukes i opptil 28 dager.

7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk in vitro.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forseglar ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3-ekstraksjonssettet, eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™-systemet. Unngå til enhver tid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement" pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter.
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner, må du ikke brette åpen BD MAX™ PCR Cartridge etter bruk. Forseglingsene på BD MAX™ PCR Cartridge er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk eller røyk på arbeidsområdet. Vask hendene etter å ha fullført testen.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, behandling og kassering av prøver.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.



8. Testprosedyre

8.1. INNSAMLING, OPPBEVARING OG TRANSPORT AV PRØVER

The VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit har blitt validert med bruk av negative nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler samlet inn i virustransportmedium (VTM) (Viracell S.L., Spania) og nukleinsyre isolert fra positive nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler samlet inn i VTM.

Andre typer prøver tatt fra nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler i VTM må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal luftveisprøver samles inn og merkes på egnet måte i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene skal transporteres ved 2 til 8 °C i opptil 48 timer, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogent materiale. For langvarig transport (over 48 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤ -20 °C. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved 2 til 8 °C i opptil 48 timer eller fryses ved -20 °C eller ideelt sett ved -70 °C for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/tining bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

8.2. KLARGJØRING AV PRØVER OG RNA-EKSTRAKSJON

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som blir benyttet, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

1). Pipettér mellom 200 og 750 μ l av den nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepenselen samlet inn i virustransportmediumet (VTM) ned i et BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube og lukk røret med en membranhetten. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Neste steg er BD MAX™-systemet.

8.3. PCR-PROTOKOLL

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for detaljerte instruksjoner.

8.3.1. Opprette et PCR-testprogram for VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermen "Run" (Kjør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene.
- 4) Fra nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) Fra nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".



- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til volumet av den kliniske prøven som benyttes pluss 500 µL.
- a. Eksempel: Hvis det pipetteres 200 µL av den kliniske luftveisprøven ned i et BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, skal parameteren settes til 700 µL.
- b. Merk: Maksimal daglig dose er 950 µL.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 2).
- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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

Tabell 2. PCR-innstillinger.

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnssignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

- 9) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 3)

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-	

Tabell 3. Parametere for spektral krysstale.

- 10) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 4).



Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Revers transkripsjon	Vent	1	900	45°C	-
Innledende denaturering	Vent	1	120	98°C	-
Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling)	2 - Temperatur	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabell 4. PCR-protokoll

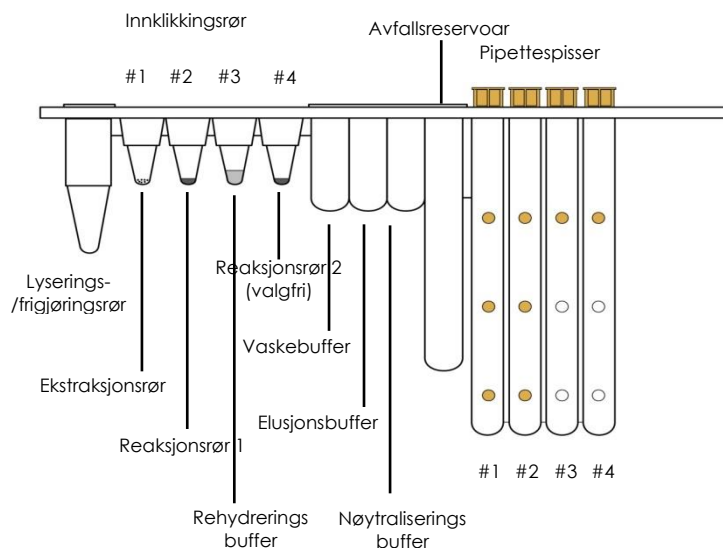
- 11) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- For hver prøve som skal testes, ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK TNA-3-settet. Bank forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett den i BD MAX™-systemets prøvestativ.
- Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK TNA-ekstraksjonsrør (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk ekstraksjonsrøret(ene) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- Fastslå og adskill egnet antall VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (grønn folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
 - Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
 - For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen.
 - Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (oransje folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
 - For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen.



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



8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™-systemets programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (prøverør) i Worklist (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i Worklist (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™-systemet (Stativ A settes på venstre side av BD MAX™-systemet og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser påkrevd antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™-systemet.
- 9) Lukk igjen døren på BD MAX™-systemet.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...)
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermen "Run Reports" (Kjøringsrapporter).



9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan man analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 2). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 5.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™.

-Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Intern kontroll (530/565)	Tolkning
-	+	SARS-CoV-2 S-genet RNA ikke påvist
+	+/-	SARS-CoV-2 S-genet RNA påvist
-	-	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- eller forsterkningstrinn.
IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.

Tabell 5. Tolkning av prøve

+: Amplifikasjon fant sted

-: Ingen amplifikasjon fant sted

En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 40. Den interne kontrollen kan vise et amplifikasjonssignal, men ikke alltid, da et høyt kopiantall for målet kan forårsake preferensiell amplifikasjon av målspesifikke nukleinsyrer i stedet for av den interne kontrollen. I slike tilfeller er det ikke nødvendig med påvisning av den interne kontrollen.

En prøve anses som negativ hvis prøven ikke viser noe amplifikasjonssignal i påvisningssystemet og den interne kontrollen er positiv. Hemming av PCR-reaksjonen kan utelukkes hvis den interne kontrollen amplifiseres.



I tilfelle av uavklarte resultater (UNR), fravær av signal for intern kontroll i en negativ prøve, anbefales det å gjenta analysen med en 1:10 fortyntet prøve for å sjekke om det finnes problemer med hemming.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler samlet inn i VTM.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra luftveisprøver.
- Ekstremt lave målnivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av SARS-CoV-2-prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-RNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- Den spesifikke kombinasjonen av primer og probe for påvisning av *S*-genet som benyttes i VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit designet for identifikasjon av SARS-CoV-2, viser ikke signifikante kombinerte homologier med det humane genomet, human mikroflora, SARS-CoV eller andre coronavirus, som kan resultere i forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultater kan oppstå som følge av flere faktorer og kombinasjoner av disse, inkludert:
 - Feil innsamling, transport, oppbevaring og/eller håndtering av prøver.
 - Feil behandlingsprosedyrer (inkl. RNA-ekstraksjon).
 - Forringelse av virus-RNA under forsendelse/oppbevaring og/eller behandling.
 - Mutasjoner eller polymorfismer i primer- eller probe-bindende områder kan påvirke påvisning av nye eller ukjente varianter av SARS-CoV-2.
 - Virusmengden i prøven er under påvisningsgrensen for analysen.
 - Tilstedeværelse av RT-qPCR-hemmere eller andre stoffer som gir interferens. Påvirkning fra vaksiner, antivirale legemidler, antibiotika, kjemoterapeutika og immunsuppressive legemidler brukt til å forhindre COVID-19 eller brukt til behandling av infeksjonen, har ikke blitt evaluert.
 - Bruksanvisningen og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- Negative resultater utelukker ikke infeksjon med SARS-CoV-2 og bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for behandling eller andre bestemmelser relatert til håndtering av pasienter. Optimale prøvetyper og tiden for høyeste virusnivå under infeksjoner forårsaket av SARS-CoV-2 har ikke blitt fastslått. Innsamling av flere prøver (typer og tidspunkter) fra samme pasient kan være nødvendig for å påvise viruset.
- Dersom diagnostiske tester for andre respiratoriske sykdommer er negative og pasientens kliniske symptomer og epidemiologiske informasjon antyder en mulighet for infeksjon med SARS-CoV-2, bør et falskt negativt resultat vurderes og en ny testing av pasienten bør diskuteres.



- Et negativt resultat utelukker ikke tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2-virus i en klinisk prøve. Dersom kliniske observasjoner, pasienthistorikk og epidemiologisk informasjon antyder en infeksjon med COVID-19, bør det vurderes å utføre en ny test med økt mengde prøvevolum.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit inneholder en intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

12. Ytelseegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit ble testet med 4 nukleinsyrer isolert fra positive nasofaryngeale og/eller orofaryngeale prøvepensler samlet inn i VTM og 15 luftveisprøver (nasofaryngeale og/eller orofaryngeale prøvepensler samlet inn i VTM) fra pasienter med klinisk mistanke om COVID-19-sykdom eller andre lignende luftveissykdommer. Det ble funnet 4 prøver som var positive for SARS-CoV-2 og disse resultatene var i overensstemmelse med en PCR-test utviklet i henhold til China CDC Primers and probes for detection SARS-CoV-2.

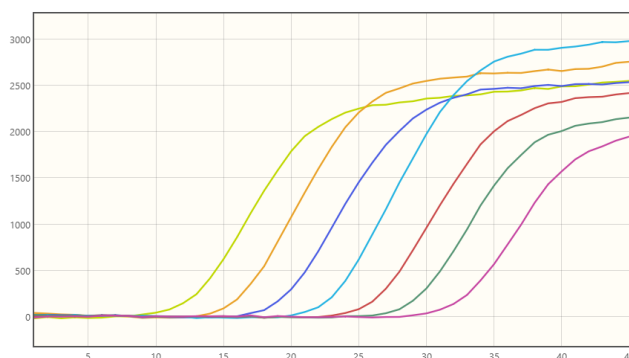
I tillegg ble de 4 positive prøvene for SARS-CoV-2 bekreftet ved hjelp av en molekylær påvisningsmetode utført av det spanske nasjonale referansesenteret (Institute of Health Carlos III (ISCIII)) (protokollen "2019-nCoV by real-time RT-PCR" foreslått av Charité (Berlin), med modifikasjoner).

For å konkludere: Resultatene viser høy sensitivitet og spesifisitet for påvisning av SARS-CoV-2 ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit har en påvisningsgrense på ≥ 24 cDNA-kopier per reaksjon (kopier/reaksjon) med en positiv rate på ≥ 95 %.

Figur 2. Fortynningsserie for SARS-CoV-2 S-genet ($2,4 \cdot 10^7$ – $2,4 \cdot 10^1$ kopier/reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™-systemet (kanal 475/520 (FAM)).



12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisitet for analyse av SARS-CoV-2 S-genet ble bekreftet ved testing av et panel bestående av forskjellige mikroorganismer som representerte de vanligste luftveispatoгенene. Ingen kryssreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene:

Test av kryssreaktivitet					
Humant adenovirus, type 1–5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-lignende virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Humant bocavirus	-	Influenzavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenzavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenzavirus A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenzavirus A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Humant metapneumovirus A og B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenzavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenzavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A og C	-	Influenzavirus A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenzavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 og 4	-
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 og HKU1	-	Influenzavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Pneumocytis jirovecii type A1 og g885652	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-lignende virus	-	Humant rhinovirus type C	-
SARS Coronavirus stamme Frankfurt 1	-	Influenzavirus B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenzavirus B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenzavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratorisk syncytialt virus (RSV) A og B	-

Tabell 6. Patogen mikroorganisme benyttet som referanse i denne studien.

12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit ble evaluert i forhold til RNA fra Human 2019-nCoV-stammen BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV-stammen 2019-nCoV/Italy-INMI1, syntetiske RNA-kontroller for to varianter av SARS-CoV-2-viruset: MT007544.1 (SARS-CoV2-isolat Australia/VIC01/2020) og MN908947.3 (SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1), med positivt resultat.











13. Bibliography/Bibliografi

- 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/NEJMod2001017.
- Verdens helseorganisasjon. Oppdatering om MERS-situasjonen. Desember 2019. Tilgjengelig på <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Siste tilgang 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. Helseministeriet. Den spanske regjeringen. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Oppdatert 27/02/2020. Tilgjengelig på https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Siste tilgang 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. Tilgjengelig på <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Siste tilgang mars 2020.
9. Verdens helseorganisasjon. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17. januar 2020. Tilgjengelig på <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Siste tilgang mars 2020.
10. Verdens helseorganisasjon. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Tilgjengelig på <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Siste tilgang mars 2020.
11. Verdens helseorganisasjon. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Midlertidig veiledning. 27. februar 2020. Tilgjengelig på [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)). Siste tilgang mars 2020.

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

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet</p>	 <p>Keep dry Holdes tørr</p>	 <p>Use by Brukes innen</p>	 <p>Manufacturer Produsent</p>	 <p>Batch code (Lot) Partikode (lot)</p>
 <p>Consult Instructions for Use Les instruksjonene før bruk</p>	 <p>Temperature limitation Temperaturgrenser</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester</p>	 <p>Sample diluent Prøvediluent</p>	 <p>Catalognumber Katalognummer</p>

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











CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01
VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC