

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**  
BIOTEC

## SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/

Manual para as seguintes referências:

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

BD REF. 444212

to be used with the BD MAX™ System

para ser utilizado com o 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) (Viracell S.L., Spain) and nucleic acid isolated from positive nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.

Another different types of samples from nasopharyngeal/oropharyngeal swabs in VTM must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 48 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 48 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 48 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

### 8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette between 200 and 750 µL of nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) into a BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

### 8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

#### 8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.



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

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

Table 2. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

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

		False Receiving Channel				
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 3. Spectral cross-talk parameters.



- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Table 4. PCR protocol.

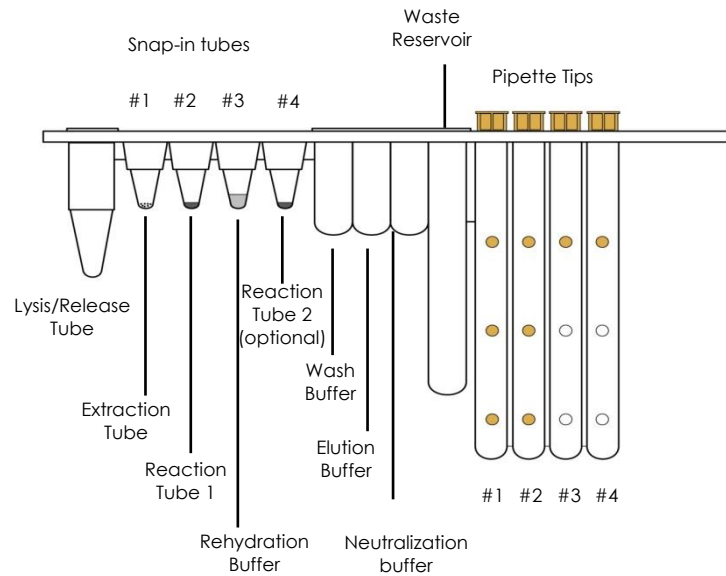
- 11) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (green foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
  - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
  - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.
    - i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
  - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.



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



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 S gene (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

### 8.3.4 BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.





## 9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 5.

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

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

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	+	<b>SARS-CoV-2 S gene RNA Not Detected</b>
+	+/-	<b>SARS-CoV-2 S gene RNA Detected</b>
-	-	<b>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.</b>
IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

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

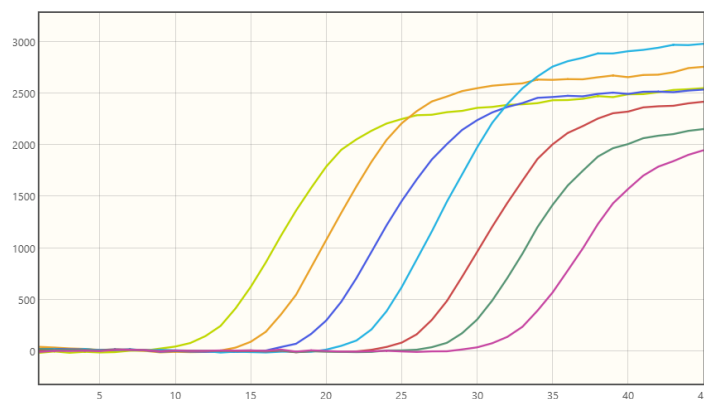
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical 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  $\geq 24$  cDNA copies per reaction (cp/rxn) with a positive rate of  $\geq 95\%$ .

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 *S* gene ( $2.4 \times 10^7$ - $2.4 \times 10^1$  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.



## PORTUGUÊS

### 1. Utilização prevista

O VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit foi concebido para a identificação e a diferenciação específicas do novo coronavírus surgido em 2019 (SARS-CoV-2) em amostras respiratórias de doentes com sinais e sintomas de infeção de COVID-19. Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar na identificação no diagnóstico da COVID-19 em combinação com sinais e sintomas clínicos do doente e fatores de risco epidemiológico. Este ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para levar a cabo a extração automática de ARN e subsequente PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com reagentes universais e descartáveis para o sistema BD MAX™. O ARN de amostras respiratórias é detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para o SARS-CoV-2.

### 2. Introdução e explicação

Os coronavírus são vírus de ARN de sentido positivo, não segmentados e encapsulados e pertencem à família Coronaviridae [1,2]. Existem seis espécies de coronavírus que se sabe causarem doenças em seres humanos [2]. Quatro vírus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causam sintomas de constipação comum e os outros dois (coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus associado a síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV)) são zoonóticos e provocam complicações mais graves [2]. O SARS-CoV e o MERS-CoV causaram mais de 10 000 casos cumulativos nas últimas duas décadas, com taxas de mortalidade de 34% no caso do MERS-CoV e de 10% no caso do SARS-CoV [1,3].

Em dezembro de 2019, algumas pessoas que trabalhavam ou residiam nas redondezas do mercado de peixe de Huanan em Wuhan, Província de Hubei, apresentaram pneumonia de causa desconhecida [2,4]. A análise profunda de sequenciação das amostras respiratórias indicou um novo coronavírus, o qual foi inicialmente designado em 2019 por novo coronavírus (2019-nCoV) e, mais tarde, por SARS-CoV-2 [5].

A transmissão entre humanos do SARS-CoV-2 foi confirmada, mesmo no período de incubação sem sintomas, e o vírus provoca doença respiratória grave, como a causada pelo SARS-CoV [1,6,7]. Embora a pneumonia seja a principal doença associada, alguns doentes desenvolveram pneumonia grave, edema pulmonar, síndrome de insuficiência respiratória aguda, ou falência de múltiplos órgãos e morte [1,4]. Os Centros de Prevenção e Controlo de Doenças (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideram que os sintomas do SARS-CoV-2 podem surgir logo ao fim de 2 dias ou apenas ao fim de 14 dias após a exposição, sendo os mais frequentes febre, tosse, mialgia e dispneia [1,4,8]. Dores de garganta, cefaleias, diarreia e vômitos constituem sintomas menos frequentes [1,4]. Aparentemente, os homens de idade mais avançada com comorbidades têm sido mais afetados [4].

O diagnóstico do SARS-CoV-2 é realizado detetando causas convencionais de pneumonia precoce e por sequenciação de próxima geração ou por métodos de RT-PCR em tempo real [1,9]. Estão disponíveis vários ensaios que detetam o SARS-CoV-2, sendo indicados no website da OMS (Organização Mundial de Saúde) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].



A OMS recomenda amostras do trato respiratório superior (esfregaços nasofaríngeas e orofaríngeas) e/ou amostras do trato respiratório inferior (expectoração, aspirado endotraqueal ou lavagem broncoalveolar) para a identificação do SARS-CoV-2 [9,11]. Adicionalmente, outras amostras clínicas, como sangue, urina e fezes, poderão ser colhidas para monitorizar a presença do vírus [9,11].

### 3. Princípio do procedimento

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit foi concebido para a identificação do SARS-CoV-2 em amostras respiratórias. A deteção realiza-se através de um formato RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo poço de reação. O ARN-alvo isolado é transcrito gerando ADN complementar por transcriptase reversa, seguindo-se a amplificação de uma região conservada do gene *S* utilizando oligonucleótidos específicos e uma sonda marcada com fluorescência.

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit baseia-se na atividade da exonuclease 5' da polimerase do ADN. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidroliza a sonda unida à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade de RNA alvo. Esta fluorescência é monitorizada no sistema BD MAX™.

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit contém em cada tubo todos os componentes necessários para realizar o ensaio PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado, bem como um controlo interno para monitorizar a inibição da PCR. O SARS-CoV-2 é amplificado e detetado no canal 475/520 e o controlo interno (CI) no canal 530/565.

### 4. Reagentes fornecidos

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 1:

Referência	Reagente/Material	Descrição	Cor	Quantidade
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S gene</i> reaction tube	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno em formato estabilizado.	Película verde transparente	2 envelopes de 12 tubos
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Película cor de laranja transparente	1 envelope de 24 tubos

Tabela 1. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit com Ref. VS-NCO124 (444212).

### 5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais e equipamento necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection kit Detection Kit.

- Equipamento de PCR em tempo real: sistema BD MAX™.



- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.º: 442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.º: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Pontas com filtro.
- Luvas não reutilizáveis sem pó.

## 6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contém os tubos de reação, estes podem ser utilizados até um prazo máximo de 28 dias.

## 7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais e técnicos de laboratório ou de saúde, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico in vitro.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.
- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de casa utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Em casos em que outros testes de PCR estejam a ser realizados na mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de garantir que o VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, o BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, eventuais reagentes adicionais necessários para o ensaio e o sistema BD MAX™ não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNasa/DNasa, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos de PCR.



- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Usar vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras têm de ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e têm de ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tome as precauções necessárias durante a colheita, o armazenamento, o tratamento e a eliminação das amostras.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

## 8. Procedimento do teste

### 8.1. COLHEITA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

O VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit foi validado em esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos negativos colhidos em meio de transporte viral (MTV) (Viracell S.L., Espanha) e ácido nucleico isolado a partir de esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos positivos colhidos em MTV.

Outros tipos diferentes de amostras colhidas a partir de esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos em MTV têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte dos espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em contentores limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas entre 2 °C e 8 °C durante um período máximo de 48 horas, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração (com mais de 48 horas), é recomendado o envio a  $\leq -20$  °C. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2 °C a 8 °C por um período máximo de 48 horas ou podem ser congeladas a -20 °C ou, idealmente, a -70 °C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

### 8.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DE RNA

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.





1. Pipetar entre 200 e 750 µL de esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo colhido em meio de transporte viral (MTV) para um tubo de tampão de amostra do sistema BD MAX™ (BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade.

### 8.3. FUNCIONAMENTO DO SISTEMA BD MAX™

Nota: Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter instruções mais detalhadas.

#### 8.3.1. Programação do teste PCR para o VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

Nota: Se já tiver criado o teste VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do sistema BD MAX™, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) Na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).
  - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX, em seguida, selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume da amostra ao volume do espécime clínico utilizado mais 500 µL.
  - a. Exemplo: se forem colhidos com uma pipeta 200 µL de um espécime clínico respiratório para um BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, o parâmetro deve ser ajustado para 700 µL.
  - b. Nota: o volume máximo é 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 2).
  - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX; neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para as posições 2 (verde) e 4 (azul).



Channel (Canal)	Aliás (Aliás)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Min.)	Ct Max (Ct Max.)
475/520 (FAM)	Gene S do SARS-CoV-2	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

Tabela 2. Definições de PCR.

Nota: recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 3)

		False Receiving Channel (Canal receptor falso)				
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	Channel (Canal)					
	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	-	

Tabela 3. Parâmetros de interação espectral.

- 10) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 4).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Transcriptase reversa	Retenção	1	900	45°C	-
Desnaturação inicial	Retenção	1	120	98°C	-
Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	2-Temperatura	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabela 4. Protocolo de PCR.

- 11) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

### 8.3.2. Preparação do suporte para tubos do sistema BD MAX™

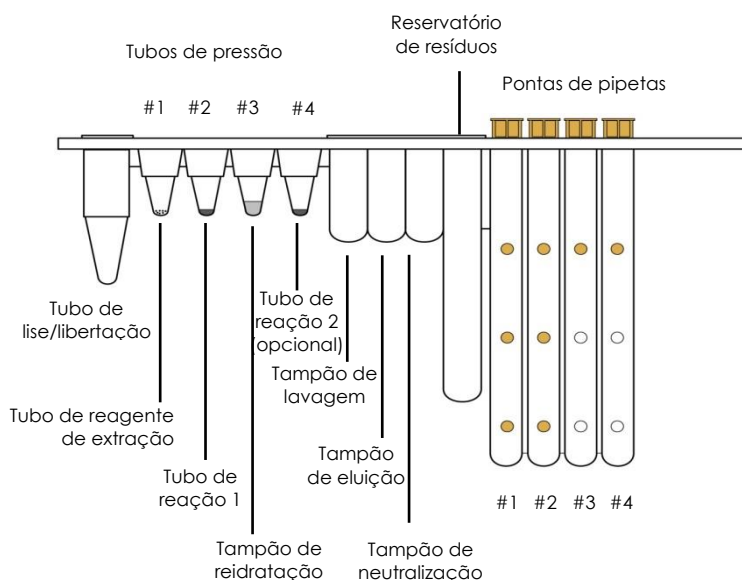
- 1) Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual do BD MAX™ ExK TNA-3 Kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do sistema BD MAX™.



- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários BD MAX™ ExK TNA (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
- 3) Determinar e separar o número adequado de VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (selo verde) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver Figura 1).
  - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
  - b. Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.
 

Nota: Se escolher o formato “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (com selo de cor diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
- 4) Remover o número necessário de tubos Rehydration Buffer Tube (selo cor de laranja) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
  - a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio.

Figura 1 Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



### 8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do sistema BD MAX™.
- 2) No menu de lista pendente "Test" (Teste), selecionar VIASURE SARS-CoV-2 S gene (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do tubo de tampão de amostra na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através da entrada manual.
- 5) Introduzir a identificação da amostra/doente na janela "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra. Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os tubos de tampão de amostra estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra preparado no(s) suporte(s) para tubos do sistema BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) para tubos no sistema BD MAX™ (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do sistema BD MAX™ e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de cartuchos BD MAX™ PCR Cartridge(s) no sistema BD MAX™.
- 9) Fechar a porta do sistema BD MAX™.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

### 8.3.5 Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...)
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) ou "Export" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução)

## 9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do sistema BD MAX™ disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 2). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.



- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 5.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do sistema BD MAX™.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

Gene S do SARS-CoV-2 (475/520)	Controlo interno (530/565)	Interpretação
-	+	SARS-CoV-2 S gene ARN não detetado
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene ARN detetado
-	-	Resultado não resolvido (UNR). Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra.
IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 5. Interpretação da amostra

+: Houve amplificação

+: Não houve amplificação

Uma amostra é considerada positiva, se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno poderá mostrar ou não um gráfico de amplificação, já que a presença de um elevado número inicial de cópias do ácido nucleico alvo pode causar uma amplificação preferencial desta última. Nestes casos, a deteção do controlo interno não é necessária.

Uma amostra é considerada negativa se não for detetada uma curva de amplificação acima do valor limiar, e o controlo interno a apresentar. A inibição da reação de PCR pode ser excluída pela amplificação do controlo interno.

Em caso de resultados não resolvidos (UNR), ausência de sinal de controlo interno em amostras negativas, é recomendado repetir o ensaio diluindo a amostra 1:10 para excluir possíveis problemas de inibição.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.



## 10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado com esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos colhidos em MTV.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- Pode-se detetar um baixo número de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido a contaminação cruzada por amostras suspeitas de SARS-CoV-2 contendo elevadas concentrações de ARN-alvo ou a contaminação devida a produtos de PCR de reações anteriores.
- A combinação de primário e sonda específica para deteção do gene *S* utilizada no VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit concebido para deteção do SARS-CoV-2, não apresenta homologies combinadas com o genoma humano, a microflora humana, o SARS-CoV ou outros coronavírus, o que pode resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
  - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
  - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ARN).
  - Degradação do ARN viral durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
  - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de primários ou sondas podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas do SARS-CoV-2.
  - Uma carga viral no espécime abaixo do limite de deteção para o ensaio.
  - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores utilizados para prevenir a COVID-19 ou utilizados durante o tratamento da infeção.
  - A não observância das instruções e do procedimento do ensaio.
- Resultados negativos não excluem a infeção pelo SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. Não foram determinados os tipos de espécimes ideais e o momento em que se alcançam os níveis virais máximos durante as infeções causadas pelo SARS-CoV-2. Pode ser necessária a colheita de vários espécimes (tipos e pontos temporais) do mesmo doente para detetar o vírus.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infeção pelo SARS-CoV-2, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.
- Um resultado negativo não exclui a presença de ARN do vírus SARS-CoV-2 num espécime clínico. Se as observações clínicas, historial do doente e informações epidemiológicas sugerirem a presença de infeção COVID-19, deve ser considerada a repetição do teste aumentando o volume da amostra.



- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, será necessário repetir o teste com o VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

## 11. Controlo de qualidade

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit contém um controlo interno (CI) em cada tubo de reação que confirma o correto desempenho da técnica.

## 12. Características do teste

### 12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit foi testado utilizando 4 ácidos nucleicos isolados a partir de esfregaços nasofaríngeos e/ou orofaríngeos positivos colhidos em MTV e 15 amostras respiratórias (esfregaços nasofaríngeos e/ou orofaríngeos em MTV) de doentes com suspeita clínica de doença COVID-19 ou outras doenças respiratórias semelhantes. Foram detetadas 4 amostras positivas para SARS-CoV-2 e estes resultados estavam de acordo com um teste de PCR desenvolvido a partir de oligonucleótidos e sondas do CDC chinês para deteção do SARS-CoV-2.

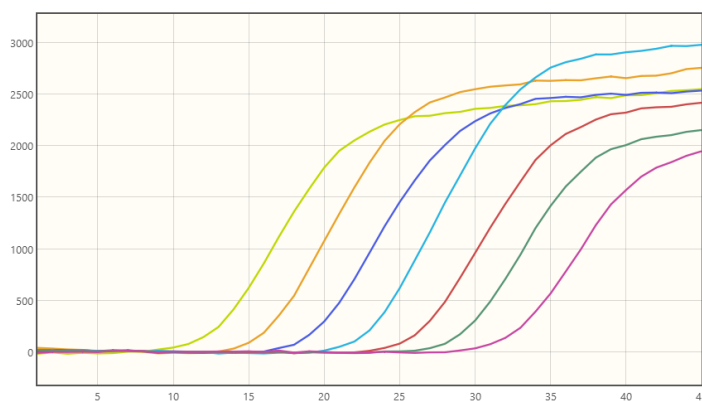
Adicionalmente, as 4 amostras positivas para SARS-CoV-2 foram confirmadas utilizando um método de deteção molecular pelo Centro de Referência Nacional Espanhol (Instituto de Saúde Carlos III (ISCIII)) (o protocolo "2019-nCoV por RT-PCR em tempo real" sugerido pela Charité (Berlim), com modificações).

Em conclusão, os resultados mostram uma elevada sensibilidade e especificidade para detetar o SARS-CoV-2 utilizando o VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit.

### 12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit tem um limite de deteção  $\geq 24$  cópias de ADNc por reação (cp/rxn), com uma taxa positiva  $\geq 95\%$ .

Figura 2 Diluições em série de um modelo do gene S do SARS-CoV-2 ( $2,4 \times 10^7$ - $2,4 \times 10^1$  cp/rxn) ensaiadas no sistema BD MAX™ (canal 475/520 (FAM)).



### 12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio do gene S do SARS-CoV-2 foi confirmada testando um painel composto por diferentes microrganismos representando os agentes patogênicos respiratórios mais comuns. Não foi detectada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Bocavírus humano	-	Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Vírus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Metapneumovírus A e B humano	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Pneumocytis jirovecii Tipo A1 e g885652	-
MERS Coronavirus	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Rinovírus humano tipo C	-
Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subespécie aureus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Vírus sincicial respiratório (RSV) A e B	-

Tabela 6. Micro-organismos e agentes patogênicos de referência utilizados neste estudo.

### 12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit foi avaliada comparativamente com ARN da estirpe de 2019-nCoV humana BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, da estirpe de 2019-nCoV humana 2019-nCoV/Italy-INM11, e dos controlos de ARN sintéticos para duas variantes do vírus SARS-CoV-2: MT007544.1 (isolado de SARS-CoV2 Australia/VIC01/2020) e MN908947.3 (isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1), revelando resultado 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/NEJMod2001017.
- Organização Mundial de Saúde. Atualização sobre a situação da MERS. Dezembro de 2019. Disponível em <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Acedido em março de 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. Ministério da Saúde. Governo Espanhol. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Atualizado em 27/02/2020. Disponível em [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento\\_COVID\\_19.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf). Acedido em março de 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. Disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Acedido em março de 2020.
9. Organização Mundial de Saúde. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance.17 de janeiro de 2020. Disponível em <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Acedido em março de 2020.
10. Organização Mundial de Saúde. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Disponível em <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Acedido em março de 2020.
11. Organização Mundial de Saúde. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Linhas de orientação interinas. 27 de fevereiro de 2020. Disponível em [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)). Acedido em março de 2020.

## 14. Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico In vitro</p>	 <p>Keep dry Armazenar em local seco</p>	 <p>Use by Data de validade</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code (Lot) Código do lote</p>
 <p>Consult Instructions for Use Consultar as instruções de utilização</p>	 <p>Temperature limitation Limitação de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for &lt;n&gt; test Contém &lt;n&gt; test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de amostra</p>	 <p>Catalognumber Número de referência</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](http://www.certest.es)



VIASURE online

F-362 rev01  
**VIASURE**



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC