

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S- gene

Handbook for the following references/

Handbok för följande referenser:

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

för användning 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 | | | | |
|--------------------|---------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 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.

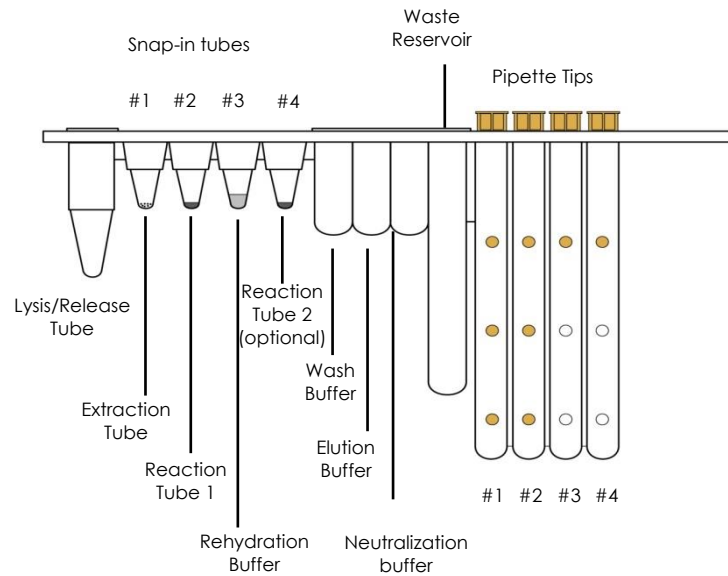
- 11) Click the "Save Test" button.

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

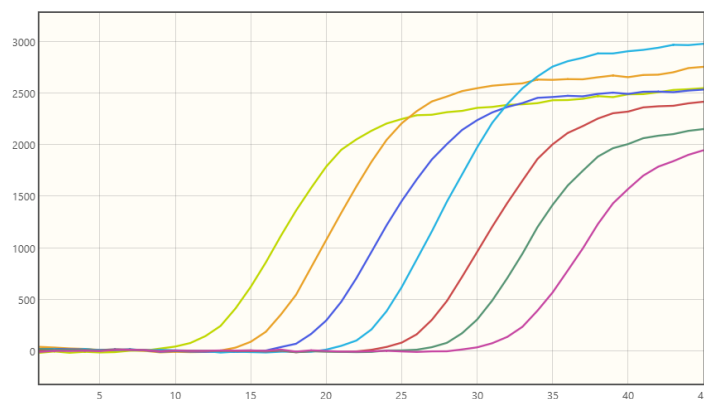
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



SVENSKA

1. Avsedd användning

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit är avsett för specifik identifiering och differentiering av det nya 2019-coronaviruset (SARS-CoV-2) i andningsprover från patienter med tecken och symtom på COVID-19-infektion. Detta test är avsett att användas som en hjälp för identifiering vid diagnos av COVID-19-infektion i kombination med patientens kliniska tecken och symtom samt epidemiologiska riskfaktorer. Analysen använder BD MAX™-systemet för automatiserad extraktion av RNA och efterföljande realtids-PCR som använder medföljande reagenser kombinerade med universella reagenser och engångsartiklar för BD MAX™-systemet. RNA från andningsprover detekteras med fluorescerande rapportörfärgprober som är specifika för SARS-CoV-2.

2. Sammanfattning och förklaring

Coronavirus är höljeförsedda och icke-segmenterade positiv sense-RNA-virus och tillhör familjen Coronaviridae [1,2]. Det finns sex arter av coronavirus som är kända för att orsaka sjukdomar hos människa [2]. Fyra virus (229E, OC43, NL63 och HKU1) orsakar vanliga förkylningssymtom och de andra två (svårt akut respiratoriskt syndrom (SARS-CoV)-coronavirus och respiratoriskt syndrom från Mellanöstern (MERS-CoV)-coronavirus) är zoonotiska och ger svårare komplikationer [2]. SARS-CoV och MERS-CoV har orsakat fler än 10 000 kumulativa fall under de senaste två årtiondena med mortalitetsfrekvenser på 34 % för MERS-CoV och 10 % för SARS-CoV [1,3].

I december 2019 fick vissa personer som arbetade på eller bodde i närheten av Huanans skaldjursmarknad i Wuhan, Hubei-provinsen i Kina, lunginflammation av okänd orsak [2,4]. Djupsekvenseringsanalys av andningsprover påvisade ett nytt coronavirus som först fick namnet nytt 2019-coronavirus (2019-nCoV) och senare SARS-CoV-2 [5].

Överföring mellan människor av SARS-CoV-2 har bekräftats, även under inkubationstiden utan symtom, och viruset orsakar svår respiratorisk sjukdom precis som SARS-CoV [1,6,7]. Även om lunginflammationen är den huvudsakliga associerade sjukdomen har ett fåtal patienter utvecklat svår lunginflammation, lungödem, akut respiratoriskt stressyndrom eller flerorgansvikt och dödsfall [1,4]. Den amerikanska myndigheten Centers of Disease Control and Prevention (CDC) tror att symtom på SARS-CoV-2 kan visa sig på så kort tid som 2 dagar eller så lång tid som 14 dagar efter exponering. Vanligaste symtom är feber, hosta, myalgi och dyspné [1,4,8]. Mindre vanliga symtom är halsont, huvudvärk, diarré och kräkningar [1,4]. Det verkar som om äldre män med komorbiditeter har påverkats i högre grad [4].

Diagnos av SARS-CoV-2 utförs genom att detektera konventionella orsaker till lunginflammation tidigt och med nästa generations sekvensering eller realtids-RT-PCR-metoder [1,9]. Flera analyser som detekterar SARS-CoV-2 finns tillgängliga för närvarande och anges på webbplatsen för WHO (World Health Organization) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO rekommenderar prover från övre luftvägarna (nasofaryngealt och orofaryngealt prov) och/eller prover från nedre luftvägarna (sputum, endotrakealt aspirat eller bronkoalveolärt lavage) för identifieringen av SARS-CoV-2 [9,11]. Dessutom kan andra kliniska prover som blod, urin och feces samlas in för att övervaka förekomsten av virus [9,11].



3. Procedurprincip

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit är avsett för identifiering av SARS-CoV-2 i andningsprover. Detektionen utförs med reelltids-RT-PCR i ett steg där omvänd transkription och efterföljande amplifiering av specifik målsekvens inträffar i samma reaktionsbrunn. Det isolerade RNA-målet transkriberas och genererar komplementär DNA med hjälp av omvänt transkriptas vilket följs av amplifieringen av en bevarad region av *S*-genen med användning av specifika primrar och en fluorescensmärkt prob.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit baseras på 5'-exonukleasaktivitet av DNA-polymeras. Under DNA-amplifiering klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen vilket separerar quencher-färgen (släckare) från rapportören. Denna reaktion genererar en ökning av fluorescenssignalen som är proportionell mot mängden av målmall. Denna fluorescens mäts på BD MAX™-systemet.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit innehåller i varje rör alla komponenter som är nödvändiga för reelltids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTP (deoxynukleosidtrifosfater), buffert, polymeras) i en stabiliserad form samt en intern kontroll för att övervaka PCR-inhibering. SARS-CoV-2 amplifieras och detekteras i kanal 475/520 och den interna kontrollen (IC) i kanal 530/565.

4. Medföljande reagenser

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit omfattar följande material och reagenser som anges i tabell 1:

| Referens | Reagens/material | Beskrivning | Färg | Mängd |
|-----------|--|---|---------------------------|--------------------|
| VS-NCO112 | SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube | En blandning av enzymer, primrar, prober, buffert, dNTP, stabiliserande medel och intern kontroll i stabiliserad form | Genomskinlig grön folie | 2 påsar med 12 rör |
| VS-RB09 | Rehydration Buffer tube | Lösning för att bereda den stabiliserade produkten | Genomskinlig orange folie | 1 påse med 24 rör |

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

5. Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren

Följande lista omfattar material och utrustning som krävs för användning men som inte medföljer VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

- Reelltids-PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexblandare.
- Mikropipetter (noggrannhet mellan 2 och 1 000 µl).
- Filterspetsar.



- Puderfria engångshandskar.

6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Satserna kan transporteras och förvaras vid 2–40 °C fram till utgångsdatumet som anges på etiketten.
- Efter öppnande kan aluminiumpåsarna som innehåller reaktionsrören användas i upp till 28 dagar.

7. Försiktighetsåtgärder

- Produkten är avsedd att endast användas av yrkesmässiga användare som t.ex. laboratoriepersonal, sjukvårdspersonal och tekniker som har utbildning i molekylärbiologiska tekniker.
- För in vitro-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller utgången material.
- Använd inte satsen om etiketten som förseglar den yttre lådan är bruten.
- Använd inte reagenser om den skyddande lådan är öppen eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om de skyddande påsarna är öppna eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om torkmedel inte finns eller inte har fungerat i reagenspåsarna.
- Ta inte ut torkmedel från reagenspåsarna.
- Stäng reagensernas skyddande påsar med blixtlåsförseglingen direkt efter varje användning. Avlägsna eventuell luft i påsarna före försegling.
- Använd inte reagenser om folien är bruten eller skadad.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller satser och/eller partier.
- Skydda reagenser från fukt. Längre tids exponering för fukt kan påverka produktprestanda.
- Förvara komponenter borta från ljus.
- I fall då andra PCR-tester utförs i samma allmänna område av laboratoriet måste varsamhet iakttas för att säkerställa att VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, ytterligare reagenser som krävs för testning och BD MAX™-systemet inte är kontaminerade. Undvik alltid kontamination av reagenser från mikroorganismer och ribonukleas (RNAs)/deoxyribonukleas (DNAs). Användning av sterila, RNAs/DNAs-fria och aerosolresistenta pipettspetsar eller pipettspetsar av typen positiv förskjutning ("positive displacement"). Använd en ny spets för varje prov. Skyddshandskar måste bytas före hantering av reagenser och kassetter.
- Bryt inte itu BD MAX™ PCR Cartridge efter användning för att undvika kontamination av miljön från amplikoner. Tätningarna på BD MAX™ PCR Cartridge är utformade för att förhindra kontamination.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det bör börja i extraktionsområdet och sedan flytta till amplifierings- och detektionsområdet. Flytta inte prover, utrustning och reagenser tillbaka till området där det föregående steget utfördes.
- Följ god laboratoriesed. Bär skyddskläder, använd engångshandskar, skyddsglasögon och mask. Ät inte, drick inte eller rök inte i arbetsområdet. Tvätta händerna efter att testet har slutförts.
- Prover måste behandlas som potentiellt smittsamma precis som alla reagenser och material som har exponerats för proverna och de måste hanteras enligt nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder vid insamling, förvaring, behandling och kassering av prover.



- Regelbunden dekontaminering av vanligt använd utrustning rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer.

8. Test procedur

8.1. INSAMLING, FÖRVARING OCH TRANSPORT AV PROVER

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit har validerats för negativa nasofaryngeala/orofaryngeala prover tagna i virustransportmedia (VTM) (Viricell S.L., Spanien) och nukleinsyra isolerad från positiva nasofaryngeala/orofaryngeala prover tagna i VTM.

Andra typer av nasofaryngeala/orofaryngeala prover i VTM måste valideras av användaren.

Insamling, förvaring och transport av prover ska ske enligt villkoren som validerats av användaren. I allmänhet ska andningsprover samlas in och märkas på lämpligt sätt i rena behållare med eller utan transportmedia (beroende på provtyp) och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Proverna får transporteras vid 2 till 8 °C i upp till 48 timmar enligt lokala och nationella bestämmelser för transporten av patogent material. För långvarig transport (mer än 48 timmar) rekommenderar vi transport vid ≤ -20 °C. Det rekommenderas att använda färska prover för testet. Proverna kan förvaras vid 2 till 8 °C i upp till 48 timmar eller frysta vid -20 °C eller helst vid -70 °C för bevarande. Upprepade nedfrysningar och upptiningar bör undvikas för att förhindra nedbrytning av provet och nukleinsyromna.

8.2. PROVBEREDNING OCH RNA-EXTRAKTION

Utför provberedning enligt rekommendationerna i bruksanvisningen för extraktionssatsen som används, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Observera att vissa andra prover kan kräva förbearbetning. Tillämpningsspecifika procedurer för extraktionsförberedelse ska utvecklas och valideras av användaren.

1. Pipettera mellan 200 och 750 µl nasofaryngealt/orofaryngealt prov taget i virustransportmedia (VTM) i ett BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™-systemet.

8.3. PCR-PROTOKOLL

Obs! Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för detaljerade anvisningar.

8.3.1. Skapa PCR-testprogram för VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

Obs! Om du redan har skapat testet VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på BD MAX™-systemets skärm "Run" (Kör).



- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Döp testet, dvs. VIASURE SARS-CoV-2 S-gene i fönstret "Test Name" (Testnamn).
- 4) Välj "ExK TNA-3" i listrutan "Extraction Type" (Extraktionstyp).
- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i listrutan "Master Mix Format" (Masterblandningsform).
 - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE for BD MAX-test och välj då "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med rehydreringsbuffert (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierad) i "Sample extraction parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till volymen som används för det kliniska provet plus 500 µl.
 - a. Exempel: Ställ in parametern på 700 µl om 200 µl kliniskt andningsprov pipetteras i ett BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube.
 - b. Obs! Maximal inställning är 950 µl.
- 7) Välj "Call Ct at Threshold Crossing" (Hämta Ct vid tröskelvärdesgräns) i "Ct Calculation" (Ct-beräkning).
- 8) Ange följande parametrar på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar): "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkningar) och "Threshold" (Tröskelvärde) (tabell 2).
 - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE for BD MAX™-test och "PCR settings" (PCR-inställningar) och "Test Steps" (Teststeg) ska slutföras för positionerna för rör 2 (grön) och rör 4 (blå).

| Channel (Kanal) | Alias | Gain (Förstärkning) | Threshold (Tröskelvärde) | Ct Min (Ct min.) | Ct Max (Ct max.) |
|-----------------|------------------|---------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| 475/520 (FAM) | SARS-CoV-2 S-gen | 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-inställningar.

Obs! Det rekommenderas att ställa in minimitröskelvärdena som anges ovan för varje kanal som en startpunkt men de slutliga inställningarna måste fastställas av slutanvändaren under resultatolkningen för att säkerställa att tröskelvärdena faller inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och över eventuell bakgrundssignal. Tröskelvärdet för olika instrument kan variera på grund av olika signalintensiteter.

- 9) Ange även följande parametrar "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar) (tabell 3).



| | | False Receiving Channel (Falsk mottagarkanal) | | | | |
|--|---------|--|---------|---------|---------|---------|
| Channel (Kanal) | | 475/520 | 530/565 | 585/630 | 630/665 | 680/715 |
| Excitation Channel (Excitationskanal) | 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. Parametrar för spektral överhörning.

10) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 4).

| Step Name (Stegnamn) | Profile Type (Profiltyp) | Cycles (Cykler) | Time (s) (Tid (s)) | Temperature (Temperatur) | Detect (Detektion) |
|--|-----------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Omvänd transkription | Uppehåll | 1 | 900 | 45°C | - |
| Inledande denaturering | Uppehåll | 1 | 120 | 98°C | - |
| Denaturering och hybridisering/förlängning (datainsamling) | 2-temperatur | 45 | 10 | 95°C | - |
| | | | 58 | 60°C | ✓ |

Tabell 4. PCR-protokoll.

11) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).

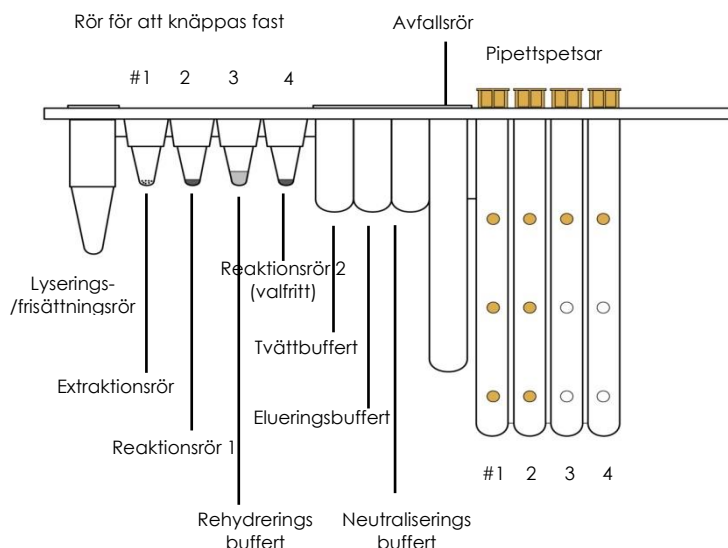
8.3.2. Installation av BD MAX™-ställ

- För varje prov som ska testas ska du ta ut en sammansatt reagensremsa från BD MAX™ ExK TNA-3-satsen. Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor finns på rörens botten och ladda den på BD MAX™-systemets provrörsställ.
- Ta ut nödvändigt antal BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (vit folie) från den skyddande påsen. Knäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner på TNA-remsan (rörposition 1, vit färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
- Bestäm och separera lämpligt antal reaktionsrör för VIASURE SARS-CoV-2 S-gene (grön folie) och knäpp fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 2, grön färgkodning på stället, se figur 1).
 - Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.
 - Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen.
 - Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)) (avsnitt 8.3.1) ska du bestämma och separera lämpligt antal ytterligare VIASURE-reaktionsrör (annan folie) och knäppa fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 4, blå färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.



- 4) Ta ut lämpligt antal Rehydration Buffer tube (orange folie) och knäpp fast rören på motsvarande positioner på remsan (rörposition 3, färglös kodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
 - a. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rørets botten och att den inte klibbar fast på rørets övre del eller på folieförseglingen.

Figur 1. BD MAX™ TNA-reagensremsa (TNA) från BD MAX™ ExK TNA-3-sats.



8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrument

- 1) Välj fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Kör) i BD MAX™-systemets programvara v4.50A eller senare.
- 2) I listrutan "Test" (Test) väljer du VIASURE SARS-CoV-2 S gene (se avsnitt 8.3.1 om det inte redan har skapats).
- 3) Välj lämpligt satslotnummer (finns angivet på den använda extraktionssatsens ytterlådå) från listrutan (valfritt).
- 4) Ange provbuffetrørets identifikationsnummer i fönstret för "Sample tube" (Provrør) i "Work list" (Arbetslistan), antingen genom att läsa av streckkoden med en streckkodsläsare eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i fönstret för prov-/patient-ID och/eller accession i "Work list" (Arbetslistan) och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla provbuffetrør har angivits. Säkerställ att prov-/patient-ID och provbuffetrør noga överensstämmer.
- 6) Placera det förberedda provbuffetrøret i BD MAX™-stället.
- 7) Ladda stället/ställen i BD MAX™-systemet (ställ A är positionerat på BD MAX™-systemets vänstra sida och ställ B på dess högra sida).
- 8) Placera lämpligt antal BD MAX™ PCR Cartridge i BD MAX™-systemet.
- 9) Stäng BD MAX™-systemets lucka.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att påbörja proceduren.



8.3.5 BD MAX™-rapport

- 1) Klicka på knappen "Results" (Resultat) i huvudmenyn.
- 2) Antingen dubbelklicka på din körning i listan eller tryck på "visningsknappen".
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details, Test Details and Plot..." (Körningsinformation, testinformation och kurva ...).
- 4) Klicka på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapport).

9. Resultattolkning

Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för en detaljerad beskrivning av dataanalys.

Dataanalys utförs av BD MAX™-programvaran enligt tillverkarens anvisningar. BD MAX™-programvaran rapporterar Ct-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje testat prov på följande sätt:

- Ct-värde på 0 anger att det inte fanns något Ct-värde beräknat av programvaran med det specificerade tröskelvärdet (se tabell 2). Amplifieringskurvan för provet med ett Ct-värde på 0 måste kontrolleras manuellt.
- Ct-värde på -1 anger att ingen amplifieringsprocess har inträffat.
- Ett annat Ct-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och enligt riktlinjerna för provtolkning som finns i tabell 5.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att bekräfta korrekt funktion av amplifieringsblandningen. Kontrollera dessutom att det inte föreligger någon rapport om BD MAX™-systemfel.

-Resultat bör avläsas och analyseras med hjälp av följande tabell:

| SARS-CoV-2 S-gen (475/520) | Intern kontroll (530/565) | Tolkning |
|----------------------------|---------------------------|--|
| - | + | SARS-CoV-2 S-gen-RNA inte detekterad |
| + | +/- | SARS-CoV-2 S-gen-RNA detekterad |
| - | - | Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller amplifieringen. |
| IND | IND | Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod. |
| INC | INC | Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras. |

Tabell 5. Provtolkning

+: Amplifiering inträffade

-: Ingen amplifiering inträffade



Ett prov anses vara positivt om Ct-värdet som erhålls är lägre än 40. Den interna kontrollen kan visa eller visar inte en amplifieringssignal eftersom ett högt kopiaantal av målet kan orsaka föredragen amplifiering av målspecifika nukleinsyror i stället för den interna kontrollen. I dessa fall är detektion av den interna kontrollen inte nödvändig.

Ett prov anses vara negativt om provet inte visar någon amplifieringssignal i detektionssystemet men den interna kontrollen är positiv. En inhibering av PCR-reaktionen kan uteslutas genom amplifieringen av den interna kontrollen.

I fall av olösta resultat (UNR), frånvaro av signal för den interna kontrollen i negativa prover, rekommenderas att analysen upprepas genom att späda provet 1:10 för att kontrollera om det föreligger eventuella problem med inhibering.

Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.

10. Testets begränsningar

- Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om denna analys kan användas med andra typer av prover, har den validerats med nasofaryngealt/orofaryngealt prov taget i VTM.
- Testets kvalitet beror på provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra från andningsprover måste ske på lämpligt sätt.
- Extremt låga nivåer av mål under detektionsgränsen kan detekteras men resultaten är kanske inte reproducerbara.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av prover som misstänks innehålla SARS-CoV-2 med höga koncentrationer av mål-RNA eller kontamination på grund av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- Den specifika kombinationen av primer/prob för detektion av *S*-genen, som används i VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit avsett för detektion av SARS-CoV-2, uppvisar inte signifikanta kombinerade homologier med humangenom, humanmikroflora, SARS-CoV eller andra coronavirus vilket kan resultera i förutsägbart falskt positivt resultat.
- Falskt negativa resultat kan uppkomma från flera olika faktorer och kombinationer av dessa, inklusive:
 - Olämplig insamling, transport, förvaring och/eller hantering av prover.
 - Olämpliga bearbetningsmetoder (inklusive RNA-extraktion).
 - Nedbrytning av virus-RNA vid transport/förvaring och/eller bearbetning av prover.
 - Mutationer eller polymorfism i bindningsregioner för primer eller prob kan påverka detektion av nya eller okända SARS-CoV-2-varianter.
 - En virusbelastning i provet under analysens detektionsgräns.
 - Förekomst av RT-qPCR-hämmare eller andra typer av interfererande ämnen. Inverkan av vacciner, antivirala läkemedel, antibiotika, cellgifter eller immunsänkande läkemedel som används för att förhindra COVID-19 eller som används under behandlingen av infektionen har inte utvärderats.
 - Ohörsamhet gällande bruksanvisningar och anvisningar om analysmetoden.



- Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och ska inte användas som den enda grunden för beslut om behandling eller annan patienthantering. Optimala provtyper och tid för virustoppnivåer vid infektioner orsakade av SARS-CoV-2 har inte fastställts. Insamling av flera prover (typer och tidpunkter) från samma patient kan bli nödvändig för att detektera viruset.
- Om diagnostiska tester för andra andningsjukdomar är negativa och patientens kliniska presentation och epidemiologisk information antyder att SARS-CoV-2-infektion är möjlig, ska förekomsten av ett falskt negativt resultat övervägas och en omtestning av patienten bör diskuteras.
- Ett negativt resultat utesluter inte förekomsten av SARS-CoV-2-virus-RNA i ett kliniskt prov. Om kliniska observationer, patientens anamnes och epidemiologisk information antyder att SARS-CoV-2-infektion föreligger bör omtestning övervägas med ökad provvolym.
- Om resultaten blir olösta, obestämda eller ofullständiga med VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit krävs omtestning. Olösta prover kan vara på grund av förekomsten av inhibitorer i provet eller en inkorrekt rehydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning. Om det föreligger ett instrumentfel kommer obestämda eller ofullständiga resultat att erhållas.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit innehåller en intern kontroll (IC) i varje reaktionsrör som bekräftar korrekt prestanda för tekniken.

12. Prestandaegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

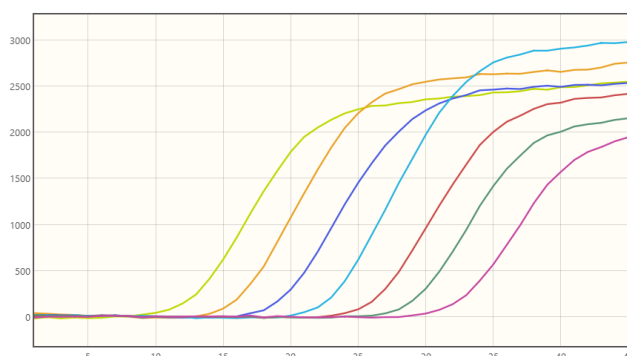
Den kliniska prestandan för VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit testades med användning av fyra nukleinsyror från positiva nasofaryngeala och/eller orofaryngeala prover tagna i VTM och 15 andningsprover (nasofaryngeala och/eller orofaryngeala prover i VTM) från patienter som misstänks ha COVID-19-sjukdom eller andra liknande respiratoriska sjukdomar. Fyra SARS-CoV-2-positiva prover påvisades och dessa resultat överensstämde med ett PCR-test utvecklat enligt primrar och prover från Kina-CDC för detektion av SARS-CoV-2. Dessutom bekräftades de fyra SARS-CoV-2-positiva proverna med en molekylär detektionsmetod av det spanska nationella referenscentret (Institute of Health Carlos III (ISCIII))(protokollet "2019-nCoV med realtids-RT-PCR" föreslaget av Charité (Berlin) med ändringar).

Sammanfattningsvis påvisar resultaten en hög sensitivitet och specificitet för att detektera SARS-CoV-2 med 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 detektionsgräns på ≥ 24 cDNA-kopior per reaktion (kopior/reaktion) med en positiv frekvens på ≥ 95 %.



Figur 2. Spädningsserier för SARS-CoV-2 S-genmall ($2,4 \cdot 10^7$ – $2,4 \cdot 10^1$ kopior/reaktion) för körning på BD MAX™-systemet (475/520 (FAM)-kanal).

12.3. Analytisk specificitet

SARS-CoV-2 S-gene analysens specificitet bekräftades genom att testa en panel av olika mikroorganismer som representerar de vanligaste respiratoriska patogenerna. Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av de mikroorganismer som testades:

| Test av korsreaktivitet | | | | | |
|--|---|--|---|--|---|
| Typer av humant adenovirus 1–5, 8, 15, 31, 40 och 41 | – | Influensa A/Kalifornien/7/2009(H1N1)pdm09-liknande virus | – | <i>Legionella dumoffii</i> | – |
| Humant bocavirus | – | Influensa A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus | – | <i>Legionella longbeachae</i> | – |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | – | Influensa A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09-virus | – | <i>Legionella micdadei</i> | – |
| <i>Bordetella holmesii</i> | – | Influensa A/Victoria/210/2009 (H3N2)-virus | – | <i>Legionella pneumophila</i> | – |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | – | Influensa A/Thüringen/5/17 (H3N2)-virus | – | Humant metapneumovirus A och B | – |
| <i>Bordetella pertussis</i> | – | Influensa A/Schweiz/9715293/2013 (H3N2)-virus | – | <i>Moraxella catarrhalis</i> | – |
| <i>Chlamydia caviae</i> | – | Influensa A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-virus | – | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | – |
| <i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A och C | – | Influensa A/södra Australien/55/2014, IVR-175 (H3N2)-virus | – | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | – |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | – | Influensa A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-virus | – | Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 och 4 | – |
| Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 och HKU1 | – | Influensa A/Anhui/1/2013 (H7N9)-virus | – | <i>Pneumocystis jirovecii</i> typ A1 och g885652 | – |
| MERS coronavirus | – | Influensa B/Brisbane/60/2008-liknande virus | – | Humant rhinovirus typ C | – |
| SARS coronavirusstam Frankfurt 1 | – | Influensa B/Florida/04/06-virus | – | <i>Staphylococcus aureus</i> ssp. aureus | – |
| <i>Haemophilus influenzae</i> MinnA | – | Influensa B/Phuket/3073/2013-virus | – | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | – |
| Influensa A/Nya Kaledonien/20/99(H1N1)-virus | – | <i>Legionella bozemanii</i> | – | Respiratoriskt syncytialvirus (RSV) A och B | – |

Tabell 6. Patogena referensmikroorganismer som används i denna studie.

12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten för VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit utvärderades med RNA från human 2019-nCoV-stam BetaCoV/Tyskland/BavPat1/2020 p.1, human 2019-nCoV-stam 2019-nCoV/Italien-INM11, syntetiska RNA-













kontroller för två varianter av SARS-CoV-2-virus: MT007544.1 (SARS-CoV2-isolat Australien/VIC01/2020) och MN908947.3 (SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1). Utvärderingen påvisade ett positivt resultat.

13. Bibliography/Bibliografi

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoA2001017.
3. Världshälsoorganisationen (WHO). Uppdatering av MERS-situation. December 2019. Tillgänglig från <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Åtkomst i 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. Hälsoministeriet. Spanska regeringen. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Uppdaterad 2020-02-27. Tillgänglig från https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Åtkomst i 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. Tillgänglig från <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Åtkomst i mars 2020.
9. Världshälsoorganisationen (WHO). Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 januari 2020. Tillgänglig från <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Åtkomst i mars 2020.
10. Världshälsoorganisationen (WHO). Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Tillgänglig från <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Åtkomst i mars 2020.
11. Världshälsoorganisationen (WHO). Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Tillfällig riktlinje. 27 februari 2020. Tillgänglig från [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)). Åtkomst i mars 2020.



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

| | | | | | | | | | |
|---|--|---|---|---|--|---|--------------------------------|---|-----------------------------------|
|  | <i>In vitro</i> diagnostic device In vitro-diagnostik |  | Keep dry Håll torrt |  | Use by Utgångsdatum d |  | Manufacturer Tillverkare |  | Batch code (Lot) Satskod (lot) |
|  | Consult Instructions for Use Se bruksanvisning |  | Temperature limitation Temperaturgräns |  | Contains sufficient for <n> test Innehåller tillräckligt för <n> tester |  | Sample diluent Provspädning |  | Catalognumber Katalognummer |

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