

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Aşağıdaki referanslar için el kitabı:

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

BD MAX™ Sistemi ile kullanmak için



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.

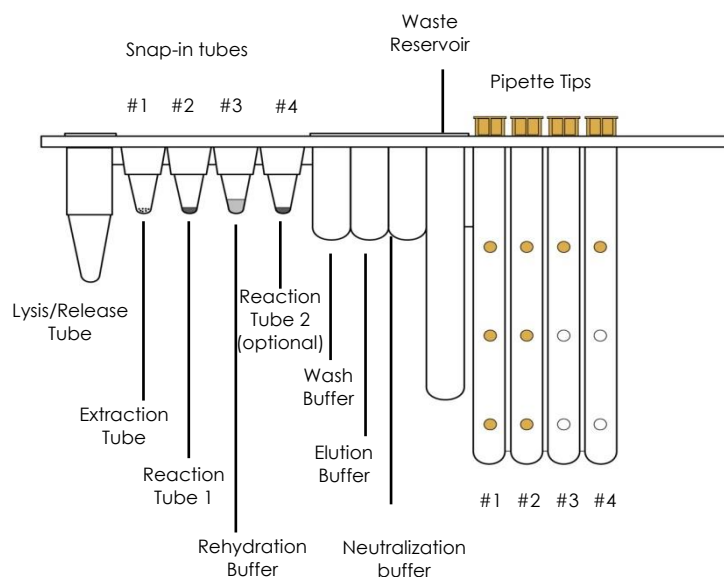
- 11) Click the "Save Test" button.

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
-	+	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

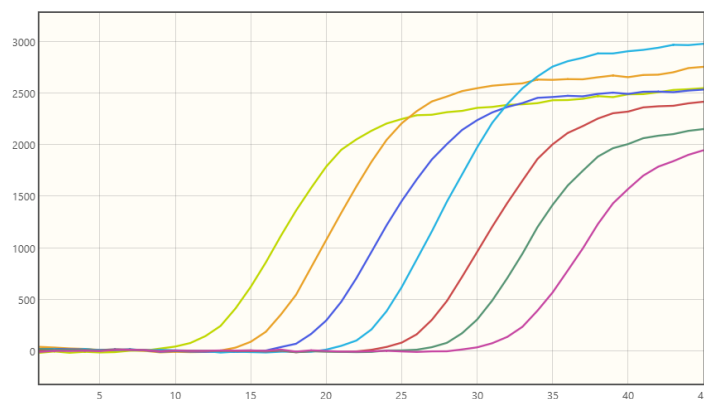
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, COVID-19 enfeksiyonu belirtileri ve semptomları olan hastalardan alınan solunum örneklerinde Yeni 2019 Coronavirüsün (SARS-CoV-2) spesifik olarak belirlenmesi ve ayrıştırılması için tasarlanmıştır. Bu tahlil, COVID-19'un, hastanın klinik belirti ve semptomları ve epidemiyolojik risk faktörleri ile birlikte tanımlanmasında yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Analiz, BD MAX™ Sistemini, otomatik olarak RNA'nın ekstraksiyonu için kullanır ve ardından BD MAX™ Sistemi için evrensel reaktifler ve atılabilir maddeler ile birlikte sağlanan reaktiflerin kullanıldığı gerçek zamanlı PCR'yi kullanır. Solunum örneklerinden alınan RNA, SARS-CoV-2'ye özgü floresan raportör boya problemleri kullanılarak saptanır.

2. Özet ve Açıklama

Koronavirüs, segmentlere ayrılmamış pozitif-duyarlı RNA virüsüdür ve Coronaviridae familyasına aittir [1,2]. İnsan hastalıklarına neden olduğu bilinen altı koronavirüs türü vardır [2]. Dört virüs (229E, OC43, NL63 ve HKU1) soğuk algınlığı semptomlarına neden olurken, diğer ikisi (ciddi akut solunum sendromu koronavirüs (SARS-CoV) ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüs (MERS-CoV) zoonotiktir ve daha ciddi komplikasyonlara neden olurlar [2]. SARS-CoV ve MERS-CoV, son yirmi yılda 10.000'den fazla kümülatif vakaya neden olmuştur ve mortalite oranları MERS-CoV için %34 ve SARS-CoV için %10'dur [1,3].

Aralık 2019'da, Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan kentindeki Huanan deniz ürünleri pazarında çalışan veya yakınlarında yaşayan bazı insanlarda, nedeni bilinmeyen pnömoni görüldü [2,4]. Solunum numunelerinin derin sekans analizi, ilk olarak 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV) ve son zamanlarda SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs ortaya koydu [5].

SARS-CoV-2'nin semptomların görülmediği kuluçka döneminde bile insandan insana bulaştığı doğrulanmıştır ve virüs, SARS-CoV virüsünün yol açtığına benzer ciddi bir solunum yolu hastalığına neden olmaktadır [1,6,7]. Pnömoni virüsle bağlantılı başlıca hastalık olmasına rağmen, az sayıda hastada ciddi pnömoni, pulmoner ödem, akut solunum yetersizliği sendromu veya çoklu organ yetmezliği ve ölüm meydana gelmiştir [1,4]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), SARS-CoV-2 semptomlarının ortaya çıkma süresinin virüse maruz kalındıktan sonra 2 gün kadar kısa veya 14 gün kadar uzun olabileceğine ve en yaygın semptomların ateş, öksürük, kas ağrısı ve nefes darlığı olduğuna inanmaktadır [1,4, 8]. Daha az görülen semptomlar boğaz ağrısı, baş ağrısı, ishal ve kusmadır [1,4]. Komorbiditesi olan yaşlı erkeklerin daha fazla etkilendiği görülmektedir [4].

SARS-CoV-2 tanısı pnömoninin geleneksel nedenlerini erkenden saptamak için yapılar ve yeni nesil sekanslama veya gerçek zamanlı RT-PCR yöntemleri ile belirlenir [1,9]. SARS-CoV-2'yi tespit eden çeşitli testler şu anda mevcuttur ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) web sitesinde listelenmişlerdir: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO, SARS-CoV-2'nin tespitinde üst solunum yolu numunelerini (nazofaringeal ve orofaringeal swablar) ve/veya alt solunum numunelerini (balgam, endotrakeal aspirat veya bronkoalveoler lavaj) önermektedir [9,11]. Ayrıca, virüsün varlığını izlemek için kan, idrar ve dışkı gibi diğer klinik numuneler de alınabilir [9,11].



3. Prosedür ilkesi

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit, solunum numunelerinde SARS-CoV-2'nin tespiti için tasarlanmıştır. Tespit, ters transkripsiyonun ve onu izleyen spesifik hedef sekans amplifikasyonunun aynı reaksiyon kuyucuğunda meydana geldiği tek adımlı gerçek zamanlı RT-PCR formatında gerçekleştirilir. İzole edilen RNA hedefi, ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA üreterek kopyalanır; bunu, korunmuş bir *S* geni bölgesinin spesifik primerler ve flüoresan etiketli bir prob kullanılarak amplifikasyonu izler.

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit, DNA polimerazının 5' eksonükleaz aktivitesine dayanır. DNA amplifikasyonu sırasında, bu enzim tamamlayıcı DNA sekansına bağlı probu ayırarak; söndürücü boyanın raportörden ayırt edilmesini sağlar. Bu reaksiyon, hedef şablonun miktarıyla orantılı olan floresan sinyalinde bir artış meydana getirir. Bu floresans BD MAX™ Sisteminde ölçülür.

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit her tüpte, stabilize edilmiş bir formatta gerçek zamanlı PCR testi için gerekli tüm bileşenleri (spesifik primer/problar, dNTPS, tampon, polimeraz) ve ayrıca PCR inhibisyonunu izlemek için bir dahili kontrol içerir. SARS-CoV-2, 475/520 kanalında ve 530/565 kanalındaki dahili kontrolde (IC) çoğaltılır ve tespit edilir.

4. Verilen reaktifler

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit, Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilen aşağıdaki maddeleri ve reaktifleri içerir:

Referans	Reaktif/Materyal	Açıklama	Renk	Miktar
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S gene</i> reaction tube	Enzimler, primer problemleri, tampon, dNTP'ler, stabilizatörler ve stabilize edilmiş formatta dahili kontrol içeren bir karışım	Şeffaf Yeşil folyo	12 tüp içeren 2 poşet
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Stabilize edilmiş ürünü sulandırmak için solüsyon	Şeffaf Turuncu folyo	24 tüp içeren 1 kese

Tablo 1. VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit Ref. VS-NCO124 (444212) ile sağlanan reaktifler ve materyaller.

5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman

Aşağıdaki liste, kullanım için gerekli olan ancak VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit içinde bulunmayan materyalleri ve ekipmanları içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ Sistemi.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 veya 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ile 1000 µL arasında hatasız).
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler



6. Taşıma ve depolama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar 2-40 °C'de sevk edilip saklanabilir.
- Reaksiyon tüplerini içeren alüminyum poşetler, açıldıktan sonra 28 güne kadar kullanılabilir.

7. Kullanıcılara uyarılar

- Ürün yalnızca moleküler biyolojik teknikler konusunda eğitimli laboratuvar veya sağlık uzmanları ve teknisyenler gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
- In vitro tanısal kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kutuyu mühürleyen etiket açılmışsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu ulaştığında açılmış veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler ulaştığında açıksa veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktif poşetler içinde kurutucu mevcut değilse veya parçalanmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Kurutucu maddeyi reaktif poşetlerinden çıkarmayın.
- Her kullanımdan sonra hemen reaktif koruyucu poşetlerin fermuarını kapatın. Kapatmadan önce poşetlerdeki fazla havayı giderin.
- Folyo kırılmış veya hasar görmüşse reaktifleri kullanmayın.
- Farklı poşetlerden ve/veya kitlerden ve/veya partilerden reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri nemden koruyun. Neme uzun süre maruz kalmak ürün performansını etkileyebilir.
- Bileşenleri ışıktan koruyun.
- Laboratuvarın genel alanında başka PCR testlerinin yapıldığı durumlarda, VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 ekstraksiyon kiti, bunun için gerekli herhangi bir reaktif ile Test ve BD MAX™ Sisteminin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktiflerin mikrobiyal ve ribonükleaz (RNaz)/deoksiribonükleaz (DNaz) kontaminasyonundan daima kaçının. Steril RNaz/DNaz içermeyen, tek kullanımlık, aerosole dirençli veya pozitif deplasmanlı pipet uçlarının kullanılması önerilir. Her numune için yeni uç kullanın. Reaktifler ve kartuşlar kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Ortamın amplikonlarla kontaminasyonunu önlemek için, BD MAX™ PCR Cartridge kullandıktan sonra parçalamayın. BD MAX™ PCR Cartridge contaları kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanında başlanmalı ve Amplifikasyon ve Tespit Alanında devam edilmelidir. Numuneleri, ekipmanı ve reaktifleri önceki adımın gerçekleştirildiği alana geri götürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyun. Koruyucu kıyafet giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında bir şey yemeyin, içmeyin veya sigara kullanmayın. Testi bitirdikten sonra ellerinizi yıkayın.
- Numuneler ile numunelere maruz kalan tüm reaktifler ve materyaller potansiyel olarak bulaşıcı muamelesi görmeli ve ulusal güvenlik düzenlemelerine uygun olarak ele alınmalıdır. Numunelerin toplanması, saklanması, işlenmesi ve bertarafı sırasında gerekli önlemleri alın.
- Yaygın olarak kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetler ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontamine edilmesi önerilir.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.



8. Test prosedürü

8.1. NUMUNELERİN TOPLANMASI, SAKLANMASI VE TAŞINMASI

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit, viral taşıma ortamında (VTM) (Viricell SL, İspanya) toplanan negatif nazofaringeal/orofaringeal swab ve VTM'de toplanan pozitif nazofaringeal/orofaringeal swabdan izole edilen nükleik asit ile doğrulanmıştır.

VTM'de toplanan nazofaringeal/orofaringeal swablardan farklı tipteki numuneler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Toplanan, saklanan ve taşınan numuneler, kullanıcı tarafından doğrulanan şartlarda muhafaza edilmelidir. Genel olarak, solunum numuneleri taşıma ortamı içeren veya içermeyen (numune türüne göre) temiz kaplarda uygun şekilde toplanmalı ve etiketlenmeli ve testin kalitesini garanti etmek için en kısa sürede işleme konmalıdır. Numuneler patojen materyalin taşınması ile ilgili yerel ve ulusal düzenlemelere uyularak, 48 saate kadar 2 - 8°C sıcaklıkta taşınmalıdır. Uzun süreli taşımalar için (48 saatten fazla), sevkiyatın °-20°C'de yapılması önerilir. Test için taze örneklerin kullanılması tavsiye edilir. Numuneler 2 ila 8°C'de 48 saate kadar saklanabilir veya muhafaza edilmek üzere -20°C'de veya ideal olarak -70°C'de dondurulabilir. Numune ve nükleik asitlerin bozulmasını önlemek için tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

8.2. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI VE RNA EKSTRAKSİYONU

Numune hazırlama işlemini kullanılan ekstraksiyon kiti olan BD MAX™ ExK™ TNA-3'nin kullanım talimatlarındaki önerilere uyararak gerçekleştirin. Bazı numunelerin ön işlem gerektirebileceğini unutmayın. Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürleri kullanıcı tarafından geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır.

1. Bir BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube içine viral taşıma ortamında (VTM) 200 ve 750 µL nazofaringeal/orofaringeal sürüntü numunesini pipetleyin ve tüpü bir septum başlığıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ Sistemini Kullanmaya geçin.

8.3. PCR PROTOKOLÜ

Not: Lütfen ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ Sistemi Kullanıcı El Kitabına bakın.

8.3.1. VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit için PCR test programı oluşturma

Not: Halihazırda VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection testi oluşturduysanız, 8.3.1 adımını atlayıp doğrudan 8.3.2'ye geçebilirsiniz.

- 1) BD MAX™ Sisteminin "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
- 2) "Create" (Oluştur) düğmesine tıklayın.
- 3) "Test Adı" (Test Name) penceresinde, testinize bir ad verin: örneğin VIASURE SARS-CoV-2 *S gene*.
- 4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-3"yi seçin.



- 5) "Master Mix Format" (Master Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5"i (Tip 5) seçin.
- a. Not: Ürün BD MAX testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu (Tip 5) Çift Master Karışım Konsantre Liyofilize MM) ögesini seçin.
- 6) "Sample extraction parameters" (Numune ekstraksiyon parametreleri) içinde "User defined" (Kullanıcı tanımlı) seçeneğini seçin ve numune hacmini kullanılan klinik numune hacmi artı 500 µL olarak ayarlayın.
- a. Örnek: BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube içine 200 µL klinik solunum numunesi pipetleyin, ardından parametreyi 700 µL olarak ayarlayın.
- b. Not: maksimum ayar 950 µL'dir.
- 7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplaması)'nda "Call Ct at Threshold Crossing" (Eşiğin Geçilmesi Halinde Ct'yi Ara)'yı seçin.
- 8) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazanımlar) ve "Threshold" (Eşik) (Tablo 2).
- a. Not: Ürün BD MAX testi için ek bir VIASURE ile birlikte kullanılabilir, snap 2 (yeşil) ve snap 4 (mavi) konumları için PCR Ayarları ve Test Adımları tamamlanmalıdır.

Channel (Kanal)	Alias (Takma İsim)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)	Ct Min (Ct Asgari)	Ct Max (Ct Azami)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S geni	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

Tablo 2. PCR ayarları.

Not: Her kanal için başlangıç noktası olarak yukarıda listelenen minimum eşik değerlerinin ayarlanması önerilir, ancak eşiklerin floresan eğrilerinin üstel fazı dahilinde ancak arka plan sinyallerinin üzerinde kalmasını sağlamak için nihai ayarların sonuç enterpolasyonu sırasında son kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekir. Farklı cihazlar için eşik değeri, farklı sinyal yoğunlukları nedeniyle değişebilir.

- 9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Spectral Cross Talk" (Spektral Tartışma) (Tablo 3) ve

		False Receiving Channel (Yanlış Alıcı Kanal)				
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasyon Kanalı)	Channel (Kanal)					
	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	-	

Tablo 3. Spektral tartışma parametreleri.



10) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesine PCR protokolünü girin (Tablo 4).

Step Name (Adım İsmi)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süreler)	Temperature (Süreler)	Detect (Tespit)
Revers transkripsiyon	Hold (Tutma)	1	900	45°C	-
Başlangıç denatürasyonu	Hold (Tutma)	1	120	98°C	-
Denatürasyon ve Yeniden Birleştirme/Genişletme (Veri toplama)	2- Temperature (Sıcaklık)	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tablo 4. PCR protokolü.

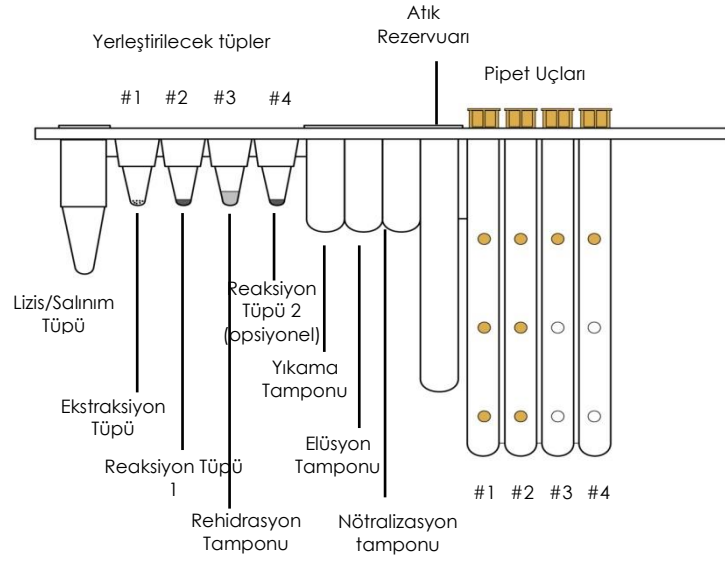
11) "Save Test (Testi Kaydet)" düğmesine tıklayın.

8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu.

- 1) Test edilecek her bir numune için, BD MAX™ ExK TNA-3 kitinden bir adet Birimlere Ayrılmış Reaktif Şerit çıkarın. Tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olduğundan ve BD MAX™ Sistemi numune raflarına yüklendiğinden emin olmak için her bir şeridi hafifçe sert bir yüzeye vurun.
- 2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK TNA Ekstraksiyon Tüpü'nü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü/Tüplerini (beyaz folyo) TNA şeridindeki ilgili pozisyonlara yerleştirin (1. Yerleştirme pozisyonu, raftaki beyaz renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
- 3) Uygun sayıda VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (yeşil folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritte karşılık gelen konumlarına yerleştirin (2. Yerleştirme pozisyonu, raftaki yeşil renkli kodlama. Şekil 1'e bakın).
 - a. Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
 - b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun.
 - i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışimli Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)) (Bölüm 8.3.1) formatını seçtiyseniz, uygun sayıda ilave VIASURE reaksiyon tüpünü (farklı folyo) belirleyin ve ayırın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (4. Yerleştirme pozisyonu, raftaki mavi renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
- 4) Gerekli sayıda Rehydration Buffer tubes (turuncu folyo) çıkarın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (3. Yerleştirme pozisyonu, raftaki renksiz kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
 - a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun.



Şekil 1. BD MAX™ ExK TNA-3 kitiindeki BD MAX™ TNA Reaktif Şerit (TNA).



8.3.3. BD MAX™ Cihaz kurulumu.

- 1) BD MAX™ Sistem yazılımı v4.50A veya daha üstü sürümünde "Run" (Çalıştır) ekranında "Work List" (İş Listesi) sekmesini seçin.
- 2) "Test" aşağı açılır menüsünde VIASURE SARS-CoV-2 S gene ögesini seçin (daha önce oluşturulmadıysa, Bölüm 8.3.1'e bakın).
- 3) Aşağı açılır menüden uygun kit parti numarasını (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) seçin (isteğe bağlı).
- 4) Barkod tarayıcı ile tarayarak veya elle girerek İş "Work list" (Listesinin) "Sample tube" (Numune tüpü) penceresine Numune Tampon Tüpü kimlik numarasını girin.
- 5) İş "Work list" (Listesinin) Numune/Hasta Kimliği ve/veya Erişim (Specimen/Patient ID and/or Accession) penceresini doldurun ve "Save" (Kaydet) düğmesine tıklayın. Tüm Örnek Tampon Tüpleri girilene kadar devam edin. Numune/hasta kimliğinin ve Numune Tampon Tüplerinin doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
- 6) Hazırlanan Numune Tampon Tüpünü BD MAX™ Raflarına yerleştirin.
- 7) Rafları BD MAX™ Sistemine yükleyin (A Rafı, BD MAX™ Sisteminin sol tarafında ve B Rafı sağ tarafta yer alır).
- 8) BD MAX™ Sistemine gerekli sayıda BD MAX™ PCR Cartridge(s) yerleştirin.
- 9) BD MAX™ Sisteminin kapağını kapatın.
- 10) Prosedüre başlamak için "Start Run" (Çalıştırmaya Başla) düğmesine tıklayın.

8.3.4 BD MAX™ raporu

- 1) Ana menüde "Results" (Sonuçlar) düğmesine tıklayın.
- 2) Ya listenizdeki çalıştır tuşuna çift tıklayın ya da "view button"a (görüntüle düğmesi) basın.
- 3) "Print" (Yazdır) ögesine tıklayın ve: "Run Details, Test Details and Plot..." (Çalıştırma Detayları, Test Detayları ve Çizit...) ögesini seçin.



4) "Run Reports" (Raporları Çalıştır) ekranında "Print or Export" (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesine tıklayın

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin nasıl analiz edileceğine dair ayrıntılı açıklama için, BD MAX™ Sistemi Kullanım Kılavuzuna bakın.

Verilerin analizi, üreticinin talimatlarına göre BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı, aşağıdaki şekilde test edilen her bir numunenin her bir tespit kanalı için Ct değerlerini ve amplifikasyon eğrilerini raporlar:

- 0'ın Ct değeri, belirtilen Eşik değerine sahip yazılım tarafından hesaplanan hiçbir Ct değerinin olmadığını gösterir (bkz. Tablo 2). "0" Ct değeri gösteren numunenin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- -1'lik Ct değeri, amplifikasyon işleminin gerçekleşmediğini gösterir.

- Diğer herhangi bir Ct değeri, amplifikasyon eğrisi ile ilintili olarak ve Tablo 5'te verilen numune yorumlama kılavuzlarına göre yorumlanmalıdır.

Amplifikasyon karışımının doğru çalıştığını doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalini kontrol edin. Ek olarak, herhangi bir BD MAX™ Sistem hatası raporu olup olmadığını kontrol edin.

-Sonuçlar aşağıdaki tabloyu kullanarak okunmalı ve analiz edilmelidir:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Dahili kontrol (530/565)	Yorumlama
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA Tespit edilmedi
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Tespit
-	-	PCR reaksiyonunda inhibitörlerin olması ya da numune işleme ve/veya amplifikasyon adımlarında genel bir sorun (hata kodu ile rapor edilmemiş) meydana gelmesi durumunda Çözümlememiş (UNR) Sonuç elde edilir.
IND	IND	Belirsiz tahlil sonucu (IND). BD MAX™ Sistem arızası nedeniyle. Bir hata koduna bağlı cihaz arızası durumunda gösterilen tahlil sonucu.
INC	INC	Eksik tahlil sonucu (INC). BD MAX™ Sistem arızası nedeniyle. Çalışmanın tamamlanamaması durumunda gösterilen tahlil sonucu.

Tablo 5. Numunelerin yorumlanması

+: Amplifikasyon meydana geldi

-: Amplifikasyon meydana gelmedi

Elde edilen Ct değeri 40'tan küçükse, numune pozitif olarak kabul edilir. Yüksek sayıda hedef kopyası olması, dahili kontrol yerine hedefe özgü nükleik asitlerin tercihli amplifikasyonuna neden olabileceğinden; dahili kontrol, bir amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir. Bu durumlarda, IC'nin tespit edilmesi gerekli değildir.

Numune, tespit sistemi içerisinde amplifikasyon sinyali göstermiyorsa ancak dahili kontrol pozitifse, numune negatif olarak kabul edilir. PCR reaksiyonunun inhibisyonu, dahili kontrolün amplifikasyonu ile hariç tutulabilir.



Çözümlememiş sonuçlarda (UNR), negatif numunede dahili kontrol sinyalinin olmaması durumunda olası inhibisyon sorunlarını kontrol etmek için numuneyi 1:10 oranında seyrelterek testi tekrarlamamız önerilir:

Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.

10. Testin kısıtlamaları

- Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Her ne kadar bu analiz diğer numune tipleriyle birlikte kullanılabilse de, VTM içinde toplanan nazofaringeal ve/veya orofaringeal swablar ile doğrulanmıştır.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; solunum numunelerinden uygun şekilde ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin varlığı önemlidir.
- Bu gibi durumlarda, tespit sınırının altında son derece düşük hedef seviyeleri tespit edilebilir, ancak sonuçlar tekrarlanamayabilir.
- Yüksek konsantrasyonlarda hedef RNA içeren SARS CoV-2 şüphesi olan numunelerin çapraz kontaminasyon nedeniyle veya önceki reaksiyonlardan kalan PCR ürünleriyle kontaminasyon gibi sebepler yüzünden hatalı pozitif sonuçların ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır.
- SARS-CoV-2'nin saptanması için tasarlanmış VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit ürününde kullanılan *S* geninin saptanmasına yönelik spesifik primer ve prob kombinasyonu; insan genomu, insan mikroflorası, SARS-CoV veya diğer koronavirüslerle tahmin edilebilir yalancı pozitif sonuca yol açabilecek önemli birleşik homolojiler göstermez.
- Yalancı Negatif sonuçlar, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden ve bunların kombinasyonlarından kaynaklanabilir:
 - Uygun olmayan numune toplama, taşıma, depolama ve/veya işleme yöntemleri.
 - Uygun olmayan işleme prosedürleri (RNA ekstraksiyonu dahil).
 - Numunelerin nakliyesi/depolanması ve/veya işlenmesi sırasında viral RNA'nın degradasyonu.
 - Primer veya prob bağlama bölgelerindeki mutasyonlar veya polimorfizmler yeni veya bilinmeyen SARS-CoV-2 varyantlarının tespitini etkileyebilir.
 - Numunede test için tespit sınırının altında viral yük.
 - RT-qPCR inhibitörlerinin veya diğer etkileşen madde türlerinin varlığı. COVID-19'u önlemek için kullanılan veya enfeksiyonun tedavisi sırasında kullanılan aşılardan, antiviral terapötik ajanların, antibiyotiklerin, kemoterapötik ajanların veya immünosüpresan ilaçların etkileri değerlendirilmemiştir.
 - Kullanım talimatlarına ve test prosedürüne uyulmaması.
- Negatif sonuçlar SARS-CoV-2 enfeksiyonunu dışlamaz ve tedavi veya diğer hasta yönetimi kararları için yegane dayanak olarak kullanılmamalıdır. SARS-CoV-2'nin neden olduğu enfeksiyonlar sırasında tepe viral seviyeleri için optimum numune tipleri ve zamanlaması belirlenmemiştir. Virüsü tespit etmek için aynı hastadan birden fazla numune (tip ve zaman noktası) alınması gerekebilir.
- Diğer solunum yolu hastalıkları için tanısal testler negatifse ve hastanın klinik sunumu ve epidemiyolojik bilgileri SARS-CoV-2 enfeksiyonunun mümkün olduğunu gösteriyorsa, sonucun yalancı negatif olabileceği düşünülmeli ve hastanın yeniden test edilmesi tartışılmalıdır.



- Negatif sonuç, klinik bir numunede SARS-CoV-2 virüsü RNA'sının varlığını dışlamaz. Klinik gözlemler, hasta öyküsü ve epidemiyolojik bilgiler COVID-19 enfeksiyonuna işaret ediyorsa, numune hacmini artırarak yeniden test yapılması düşünülmelidir.
- VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit kullanılarak Çözümlememiş, Belirsiz veya Eksik sonuçların alınması durumunda, yeniden test yapılması gerekecektir. Çözümlememiş sonuçlar, numunede inhibitörlerin varlığından veya liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün yanlış rehidrasyonundan kaynaklanabilir. Bir cihaz arızası varsa, Belirsiz veya Eksik sonuçlar elde edilecektir.

11. Kalite kontrol

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, her reaksiyon tüpünde tekniğin doğru biçimde uygulandığını onaylayan dahili bir kontrol (IC) içerir.

12. Performans özellikleri

12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit'in klinik performansı, VTM içinde toplanan pozitif nazofaringeal ve/veya orofaringeal swablardan izole edilen 4 nükleik asit ve COVID-19 hastalığı veya diğer benzer solunum yolu hastalıklarına dair klinik şüphesi olan hastalardan 15 solunum örneği (VTM içinde nazofaringeal ve/veya orofaringeal swablar) kullanılarak test edildi. Dört adet 4 SARS-CoV-2 pozitif numune bulundu ve bu sonuçlar SARS-CoV-2 tespiti için Çin CDC Primerlerine ve problemlerine göre geliştirilen bir PCR testi ile uyumluydu.

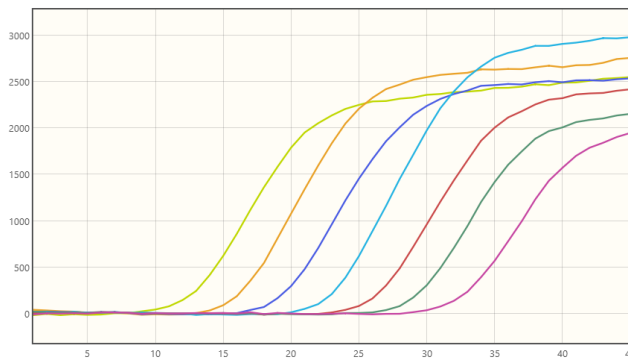
Ek olarak 4 SARS-CoV-2 pozitif numuneler, İspanyol Ulusal Referans Merkezinin (Carlos III Sağlık Enstitüsü (ISCIII)) moleküler tespit yöntemi kullanılarak da doğrulandı (değişiklikleri kapsayan Charité (Berlin) tarafından önerilen "2019-nCoV by real-time RT-PCR" protokolü).

Sonuç olarak, sonuçlar VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit kullanılarak SARS-CoV-2'nin tespit edilmesinde yüksek hassasiyet ve özgüllük ortaya koymuştur.

12.2. Analitik hassasiyet

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, \geq %95 pozitif oranla reaksiyon başına \geq 24 cDNA kopya (cp/rxn) tespit limitine sahiptir.

Şekil 2. SARS-CoV-2 S gene (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn) şablonunun BD MAX™ Sisteminde (475/520 (FAM) kanalı) çalıştırılmasında dilüsyon serileri.



12.3. Analitik özgüllük

SARS-CoV-2 S gene testinin özgüllüğü, en yaygın solunum patojenlerini temsil eden farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panel test edilerek doğrulanmıştır. Test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbiri arasında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir:

Çapraz reaktivite testi					
İnsan Adenovirus tipleri 1-5, 8, 15, 31, 40 ve 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virüsü	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
İnsan 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/5/17 (H3N2) virüsü	-	İnsan metapnömonivirüs A ve B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virüsü	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virüsü	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Chlamydia psittaci genotip A ve C	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virüsü	-	İnsan parainfluenza 1, 2, 3 ve 4 virüsleri	-
İnsan koronavirüs 229E, OC43, NL63 ve HKU1	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virüsü	-	Pneumocytis jirovecii Tıp A1 ve g885652	-
MERS Koronavirüs	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virüs	-	İnsan rinovirus tip C	-
SARS Koronavirüs Suş Frankfurt 1	-	Influenza B/Florida/04/06 virüs	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virüs	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virüs	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratuvar sinsityal virüs (RSV) A ve B	-

Tablo 6. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.

12.4. Analitik reaktivite

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kiti'nin reaktivitesi, İnsan 2019-nCoV suşu BetaCoV/Almanya/BavPat1/2020 p.1, İnsan 2019-nCoV suşu 2019-nCoV/İtalya-INM11, SARS-CoV-2 virüsünün iki varyantı için sentetik RNA kontrollerine karşı değerlendirildi: MT007544.1 (SARS-CoV2 izolat Avustralya/VIC01/2020) ve MN908947.3 (SARS-CoV-2 izolat Wuhan-Hu-1), olumlu sonuç gösteriyor.










13. Bibliography/Bibliyografya

- Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoA2001017.
- Dünya Sağlık Örgütü. MERS durum güncellemesi. Aralık 2019. Bulunduğu adres: <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Erişim: Mart 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. Sağlık Bakanlığı. İspanyol Hükümeti. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Güncelleme: 27/02/2020. Bulunduğu adres: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Erişim: Mart 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. Bulunduğu adres: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Erişim: Mart 2020.
9. Dünya Sağlık Örgütü. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 Ocak 2020 Cuma. Bulunduğu adres: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Erişim: Mart 2020.
10. Dünya Sağlık Örgütü. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Bulunduğu adres: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Erişim: Mart 2020.
11. Dünya Sağlık Örgütü. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Geçici rehberlik. 27 Şubat 2020. Bulunduğu adres: [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)). Erişim: Mart 2020.

14. Symbols for IVD components and reagents/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembolleri

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device In vitro tanı cihazı	 Keep dry Kuru halde tutun	 Use by Son kullanma tarihi	 Manufacturer Üretici	 LOT Batch code (Lot) Parti kodu (Lot)
 i	Consult Instructions for Use Kullanım Talimatlarına Bakın	 Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması	 Contains sufficient for <n> test <n> testi için yeterli içerik	DIL Sample diluent Numune dilüsyonu	 REF Catalognumber Katalog numarası

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