

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/

Manual pentru următoarele referințe

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

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System

a se utiliza împreună cu sistemul BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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



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

3. Principle of the procedure

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

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

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains in each tube all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. SARS-CoV-2 is amplified and detected in channel 475/520 and the internal control (IC) in 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 μ L.
 - a. Example: If pipette 200 μ L of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 700 μ L.
 - b. Note: maximum setting is 950 μ L
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

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

Table 2. PCR settings.

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

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

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

Table 3. Spectral cross-talk parameters.



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

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

Table 4. PCR protocol.

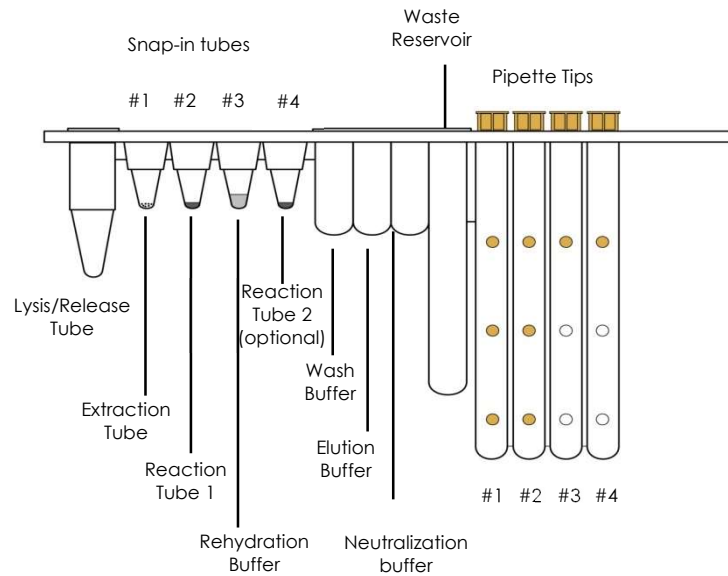
- 11) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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.
- 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.
- 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).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - 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.
 - 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.
- 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.
 - 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

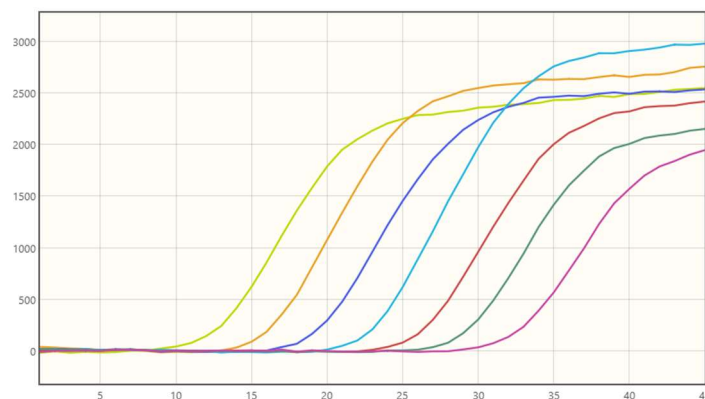
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical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



ROMÂNĂ

1. Domeniu de utilizare

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit este destinat pentru identificarea specifică și diferențierea noului coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) în probele respiratorii de la pacienții cu semne și simptome de infecție cu COVID-19. Acest test este destinat pentru utilizare ca auxiliar în identificarea diagnosticului de COVID-19, împreună cu semnele și simptomele clinice ale pacientului și cu factorii de risc epidemiologic. Testul utilizează sistemul BD MAX™ pentru extragerea automată a ARN și efectuarea ulterioară în timp real a PCR, folosind reactivii furnizați în combinație cu reactivi universali și cu consumabile pentru sistemul BD MAX™. ARN din probele respiratorii este detectat utilizând sonde reporter cu pigment fluorescent, specifice pentru SARS-CoV-2.

2. Rezumat și explicare

Coronavirusul este un virus încapsulat, nesegmentat, cu ARN de sens pozitiv, aparținând familiei *Coronaviridae* [1,2]. Sunt cunoscute șase specii de coronavirus care cauzează boli la om [2]. Patru viruși (229E, OC43, NL63 și HKU1) cauzează simptome comune de răceală iar ceilalți doi (coronavirusul sindromului respirator acut sever și (SARS-CoV) coronavirusul sindromului respirator din orientul Mijlociu (MERS-CoV)) sunt zoonotici și produc complicații mai severe [2]. SARS-CoV și MERS-CoV au cauzat, în mod cumulat, peste 10.000 de cazuri în ultimele două decenii, cu rate ale mortalității de 34% pentru MERS-CoV și 10% pentru SARS-CoV [1,3].

În decembrie 2019, un număr de oameni care lucrau sau locuiau în zona pieței de fructe de mare Huanan din Wuhan, provincia Hubei, China, au prezentat pneumonie de cauză necunoscută [2,4]. Analiza de secvențiere profundă a probelor respiratorii a indicat un nou coronavirus, care inițial a fost numit noul coronavirus 2019 (2019-nCoV), iar mai apoi SARS-CoV-2 [5].

Transmiterea de la om la om a SARS-CoV-2 a fost confirmată, chiar și în perioada de incubare fără simptome, iar virusul cauzează boală respiratorie severă la fel ca cea produsă de SARS-CoV [1,6,7]. Deși pneumonia este principala boală asociată, un număr mic de pacienți au dezvoltat pneumonie severă, edem pulmonar, sindrom de detresă respiratorie acută, insuficiență organică multiplă și deces [1,4]. Centrele de prevenire și control al bolilor (CDC) consideră că simptomele de SARS-CoV-2 pot apărea între 2 și 14 zile de la expunere, cele mai frecvente dintre acestea fiind febră, tuse, mialgie și dispnee [1,4,8]. Simptome mai puțin frecvente sunt durerea în gât, cefaleea, diareea și vărsăturile [1,4]. Se pare că bărbații mai în vârstă, cu comorbidități, sunt mai afectați [4].

Diagnosticul SARS-CoV-2 se efectuează prin detectarea precoce a cauzelor convenționale de pneumonie și și detectare prin secvențiere de nouă generație sau metode RT-PCR în timp real [1,9]. Câteva teste care detectează SARS-CoV-2 sunt în prezent disponibile, fiind listate pe site-ul web al OMS (Organizația Mondială a Sănătății) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

OMS recomandă utilizarea probelor din tractul respirator superior (tampoane de la nivel nasofaringian și orofaringian) și/sau a probelor din tractul respirator inferior (spută, aspirat endotraheal sau lavaj bronhoalveolar)



pentru identificarea SARS-CoV-2 [9,11]. În plus, pot fi recoltate alte probe clinice precum sânge, urină și scaun, pentru a se monitoriza prezența virusului [9,11].

3. Principiile procedurii

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit este destinat pentru identificarea SARS-CoV-2 în probele respiratorii. Detectarea se face prin RT-PCR în timp real, în formatul într-o singură etapă, prin care transcripția inversă și amplificarea ulterioară a secvenței țintă specifice au loc în același godeu de reacție. Ținta ARN izolată este transcrisă cu generarea de ADN complementar cu ajutorul revers transcriptazei, urmată de amplificarea unei regiuni conservate a genei *S* folosind primeri specifici și o sondă cu marcaj fluorescent.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit se bazează pe activitatea de tip 5' exonuclează a ADN polimerazei. În cursul amplificării ADN, această enzimă clivează sonda legată la secvența de ADN complementar, separând molecula blocantă de substanța fluoroforă. Această reacție generează o creștere a semnalului fluorescent care este proporțională cu cantitatea de model țintă. Această fluorescență este măsurată de sistemul BD MAX™.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit conține în fiecare tub toate componentele necesare pentru testul PCR în timp real (primeri/sonde specifice, dNTPS, tampon, polimerază) într-un format stabilizat, precum și ca control intern pentru monitorizarea inhibării PCR. SARS-CoV-2 este amplificat și detectat în canalul 475/520 și controlul intern (IC) în canalul 530/565.

4. Reactivi furnizați

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit include următoarele materiale și reactivi, prezentate în detaliu în Tabelul 1:

Referință	Reactiv/Material	Descriere	Culoare	Cantitate
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	Un amestec de enzime, sonde, primeri, tampon, dNTPs, stabilizatori și control intern în format stabilizat.	Transparent Folie verde	2 pungi cu câte 12 tuburi
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Soluție pentru reconstituirea produsului stabilizat	Transparent Folie portocalie	1 pungă cu 24 tuburi

Tabelul 1 Reactivi și materiale furnizate în VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit cu Ref. VS-NCO124 (444212).

5. Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator

Lista de mai jos include materiale și echipamente care sunt necesare pentru utilizare, însă nu sunt incluse în VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit.

- Instrument PCR în timp real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 sau 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).



- Vortex.
- Micropipete (cu funcționare precisă între 2 și 1000 µl).
- Vârfuri filtrante.
- Mănuși consumabile, fără pulbere.

6. Condiții de transport și depozitare

- Kiturile pot fi transportate și depozitate la 2-40°C până la data de expirare, care este înscrisă pe etichetă.
- După deschiderea pungilor de aluminiu care conțin tuburile de reacție, acestea pot fi utilizate timp de până la 28 de zile.

7. Precauții pentru utilizatori

- Acest produs este destinat pentru utilizare numai de către utilizatori profesioniști, cum sunt profesioniști de laborator sau din domeniul sănătății și tehnicieni, instruiți în ceea ce privește tehnicile de biologie moleculară.
- Pentru utilizare în diagnostic *in vitro*.
- Nu utilizați reactivi și/sau materiale expirate.
- Nu utilizați kitul dacă eticheta care sigilează cutia exterioră este ruptă.
- Nu utilizați reactivii dacă cutia de protecție este deschisă sau ruptă la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă pungile de protecție sunt deschise sau rupte la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă desiccantul nu este prezent sau este rupt în interiorul pungilor cu reactivi.
- Nu îndepărtați desiccantul din pungile cu reactivi.
- Închideți prompt pungile de protecție care conțin reactivi, cu fermoarul, după fiecare utilizare. Îndepărtați din pungi aerul în exces înainte de sigilare.
- Nu utilizați reactivii dacă folia a fost ruptă sau deteriorată.
- Nu amestecați reactivii din pungi și/sau kituri și/sau loturi diferite.
- Protejați reactivii împotriva umidității. Expunerea prelungită la umiditate poate afecta performanța produsului.
- Feriți componentele de lumină.
- În cazul în care sunt efectuate alte teste PCR în aceeași arie generală a laboratorului, trebuie să aveți grijă ca VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, kitul de extracție BD MAX™ ExK™ TNA-3, orice reactivi suplimentari necesari pentru testare și BD MAX™ System să nu fie contaminate. Evitați în permanență contaminarea microbiană și cu ribonuclează (RNază)/dezoxiribonuclează (DNază). Se recomandă utilizarea vârfurilor de pipetare consumabile, lipsite de RNază/DNază, rezistente la aerosoli sau cu dislocuire pozitivă. Utilizați câte un vârf nou pentru fiecare probă. Trebuie să schimbați mănușile înainte de manipularea reactivilor și cartușelor.
- Pentru a evita contaminarea mediului cu ampliconi, nu rupeți BD MAX™ PCR Cartridge după utilizare. Elementele de sigilare ale BD MAX™ PCR Cartridge sunt concepute să prevină contaminarea.
- Puneți la punct un flux de lucru unidirecțional. Acesta trebuie să înceapă în zona de extracție și să continue în zona de amplificare și zona de detectare. Nu duceți probele, echipamentele și reactivii înapoi în zona în care a fost efectuată etapa precedentă.



- Respectați bunele practici de laborator. Purtați echipament de protecție, utilizați mănuși de unică folosință, ochelari de protecție și mască. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în zona de lucru. Spălați-vă pe mâini după ce terminați testul.
- Probele trebuie tratate ca potențial infecțioase, ca fel ca toți reactivii și toate materialele care au fost expuse la probe și trebuie să fie manipulate conform reglementărilor naționale privind siguranța. Luați măsurile de precauție necesare în cursul recoltării, depozitării, tratării și eliminării probelor.
- Se recomandă decontaminarea cu regularitate a echipamentului utilizat, în special micropipetele și suprafețele de lucru.
- Consultați manualul de utilizare al BD MAX™ System pentru avertizări, precauții și proceduri suplimentare.

8. Procedura de testare

8.1. RECOLTAREA, DEPOZITAREA ȘI TRANSPORTUL PROBELOR

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit a fost validat pe tampon nasofaringian/orofaringian negativ recoltat în mediu de transport viral (VTM) (Vircell S.L., Spania) și acid nucleic izolat din tampon nasofaringian/orofaringian pozitiv în VTM.

Alte tipuri, diferite, de probe din tampoane nasofaringiene/orofaringiene în VTM trebuie validate de către utilizator.

Recoltarea, depozitarea și transportul probelor trebuie să se încadreze în condițiile validate de către utilizator. În general, probele respiratorii trebuie să fie recoltate și etichetate corespunzător în recipiente curate, cu sau fără mediu de transport (în funcție de tipul probei) și procesate cât mai curând posibil, pentru a se putea garanta calitatea testului. Probele trebuie transportate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C, cu respectarea reglementărilor naționale și locale pentru transportul materialelor patogene. În cazul transportului cu durată mare (mai mult de 48 de ore), recomandăm transportul la ≤-20°C. Se recomandă să se utilizeze probe proaspete pentru fiecare test. Probele pot fi depozitate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 48 de ore sau pot fi congelate la -20 °C sau, ideal, la -70 °C, pentru conservare. Trebuie evitate ciclurile repetate de congelare-decongelare, pentru a se preveni degradarea probei și a acizilor nucleici.

8.2. PREGĂTIREA PROBEI ȘI EXTRAGEREA ARN

Efectuați pregătirea probei conform recomandărilor date în instrucțiunile de utilizare ale kitului de extracție folosit, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Rețineți faptul că o parte din celelalte probe ar putea necesita pre-procesare. Procedurile de pregătire a extracției, specifice aplicației, trebuie să fie dezvoltate și validate de către utilizator.

1. Pipetați între 200 și 750 µL din tamponul nasofaringian/orofaringian recoltat pe mediul de transport viral (VTM) într-un tub pentru probă cu tampon BD MAX™ TNA-3 și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu operarea BD MAX™ System.



8.3. PROTOCOLUL PCR

Notă: Pentru instrucțiuni detaliate, vă rugăm să consultați manualul de utilizare al BD MAX™ System.

8.3.1. Crearea programului de testare PCR pentru VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit

Notă: Dacă ați creat deja testul de detectare PCR în timp real VIASURE SARS-CoV-2 S gene, puteți sări punctul 8.3.1 și să mergeți direct la 8.3.2.

- 1) Deschideți ecranul „Run” (Rulare) al BD MAX™ System, selectați fila „Test Editor” (Editor test).
- 2) Dați click pe butonul „Create” (Creare).
- 3) În fereastra „Test Name” (Nume test), introduceți numele testului, de exemplu VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) În meniul defilant „Extraction Type” (Tip extracție), selectați „ExK TNA-3”.
- 5) În meniul defilant „Master Mix Format” (Format general amestecare), alegeți „Type 5” (Tip 5).
 - b. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX suplimentar, apoi selectați „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat general de amestecare dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)).
- 6) În „Sample extraction parameters” (Parametri de extracție probă) selectați „User defined” (Definit de utilizator) și ajustați volumul probei până la volumul eșantionului clinic utilizat plus 500 µL.
 - a. Exemplu: Dacă pipetați 200 µL de eșantion clinic respirator într-un tub pentru probă cu tampon BD MAX TNA-3, setați parametrul la 700 µL.
 - b. Notă: setarea maximă este 950 µL.
- 7) În „Ct Calculation” (Calcul Ct), selectați „Call Ct at Threshold Crossing” (Apelare Ct la depășirea pragului).
- 8) În fila „PCR settings” (Setări PCR), introduceți următorii parametri: „Channel Settings” (Setări canal), „Gains” (Câștiguri) și „Threshold” (Prag) (Tabelul 2).
 - a. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX suplimentar, „PCR settings” (Setări PCR) și etapele de testare trebuie completate pentru poziția de fixare 2 (verde) și poziția de fixare 4 (albastru).

Channel (Canal)	Alias	Gain (Câștig)	Threshold (Prag)	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	Genă SARS-CoV-2 S	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

Tabelul 2 Setări PCR



Notă: Se recomandă să setați valorile de prag minime listate mai sus pentru fiecare canal la un moment inițial, dar setările finale trebuie determinate de către utilizatorul final în cursul interpretării rezultatelor, pentru a exista siguranța că pragurile se situează în interiorul fazei exponențiale a curbei de fluorescență și deasupra oricărui semnal de fundal. Valoarea prag pentru diferite instrumente poate varia datorită intensităților diferite ale semnalului.

- 9) În fila „PCR settings” (Setări PCR) introduceți și următorii parametri „Spectral Cross Talk” (Diafonie spectrală).

		False Receiving Channel (Canal fals receptor)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal excitare)	475/520	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	0,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tabelul 3 Parametri de diafonie spectrală

- 10) În fila „Test Steps” (Etape test), introduceți protocolul PCR (Tabelul 4).

Step Name (Nume etapă)	Profile Type (Tip profil)	Cycles (Cicluri)	Time (Timp) (s)	Temperature (Temperatură)	Detect (Detectare)
Reverse transcription (Transcripție inversă)	Menținere	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturare inițială)	Menținere	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturare și aliniere/extensie (Colectare date))	2 temperaturi	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabelul 4 Protocol PCR.

- 11) Dați click pe butonul „Save Test” (Salvare test).

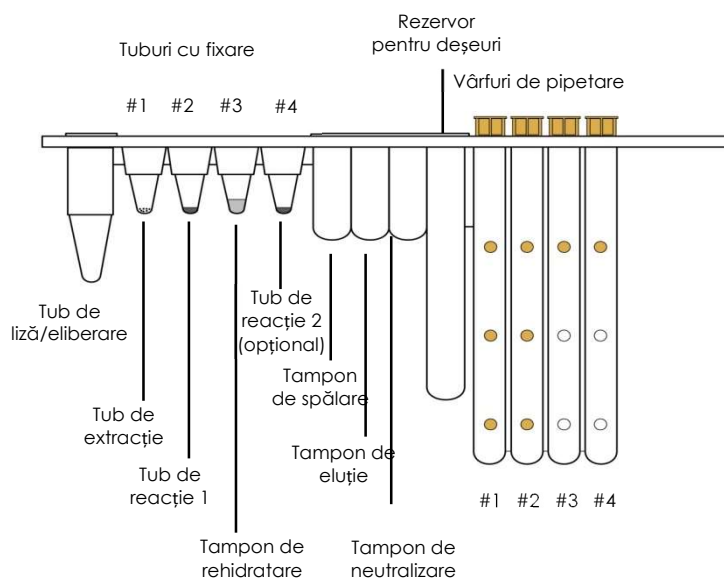
8.3.2. Configurarea stativului BD MAX™

- Pentru fiecare probă de testat, scoateți o bandetă de reactiv unitarizată din kitul BD MAX™ ExK TNA-3. Loviți cu blândețe fiecare bandetă de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate lichidele se află la fundul tuburilor și încărcăți pe stativ pentru probe ale BD MAX™ System.
- Scoateți numărul necesar de tuburi de extracție BD MAX™ ExK TNA (B4) (folie albă) din punga de protecție respectivă. Fixați tuburile de extracție (folie albă) în pozițiile corespunzătoare de pe bandetă TNA (poziția de fixare 1, cod de culoare alb pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
- Determinați și separați numărul adecvat de tuburi VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (folie verde) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandetă (poziția de fixare 2, cod de culoare verde pe stativ. Consultați Figura 1).



- a. Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
 - b. Pentru a face o rehidratare corectă, vă rugăm să vă asigurați că produsul liofilizat se află la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare.
 - i. Notă: Dacă alegeți formatul „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat de amestecare generală dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)), determinați și separați numărul adecvat de tuburi de reacție VIASURE suplimentare (folie diferită) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeleță (poziția de fixare 4, cod de culoare albastru pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
- 4) Scoateți numărul necesar de tuburi Rehydration Buffer tubes (folie portocalie) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeleță (poziția de fixare 3, fără cod de culoare pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
- a. Pentru a asigura un transfer corect, vă rugăm să vă asigurați că lichidul este la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare.

Figura 1. Bandeleță de reactiv BD MAX™ TNA (TNA) de la BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. Configurarea instrumentului BD MAX™

- 1) Selectați fila „Work List” (Listă de lucru) din ecranul „Run” al software-ului BD MAX™ System, versiunea v4.50A sau mai recentă.
- 2) În meniul defilant „Test”, selectați VIASURE SARS-CoV-2 S gene (dacă nu este deja creat în Secțiunea 8.3.1).
- 3) Selectați numărul de lot adecvat al kitului (înscris pe cutia externă a kitului de extracție utilizat) din meniul defilant (opțional).

- 4) Introduceți numărul de identificare al „Sample Buffer Tube” (tubului pentru probă cu tampon) în câmpul „Sample tube” (Tub probă) de pe „Work List” (Listă de lucru), fie prin scanarea codului de bare, fie prin introducere manuală.
- 5) Completați câmpul ID probă/pacient și/sau câmpul Număr de ordine în „Work List” (Listă de lucru) și faceți click pe butonul „Save” (Salvează). Continuați până când toate „Sample Buffer Tube” (tubului pentru probă cu tampon) sunt introduse. Asigurați-vă că există o potrivire precisă între ID probă/pacient și „Sample Buffer Tube” (tubului pentru probă cu tampon).
- 6) Puneți „Sample Buffer Tube” (tubului pentru probă cu tampon) pregătit în stativul/stativele BD MAX™.
- 7) Încărcați stativul/stativele în BD MAX™ System (stativul A este poziționat pe partea stângă a BD MAX™ System iar stativul B pe partea dreaptă).
- 8) Puneți numărul necesar de BD MAX™ PCR Cartridge(s) în BD MAX™ System.
- 9) Închideți ușa BD MAX™ System.
- 10) Dați click pe „Start Run” (Pornește rulare) pentru a începe procedura.

8.3.4. Raportul BD MAX™

- 1) În meniul principal, dați click pe „Results” (Rezultate).
- 2) Fie dați dublu click pe rularea dorită în listă, fie apăsați „view button” (butonul de vizualizare).
- 3) Dați click pe „Print” (Imprimare) și selectați: „Run Details, Test Details and Plot...” (Detalii rulare, detalii test și compilare...)
- 4) Dați click pe „Print or Export button” (Butonul Imprimare sau Export) din ecranul „Run Reports” (Rapoarte rulare).

9. Interpretarea rezultatelor

Pentru o descriere detaliată a modului de analiză a datelor, consultați manualul de utilizare a BD MAX™ System.

Analiza datelor este efectuată de către software-ul BD MAX™, conform instrucțiunilor producătorului. Software-ul BD MAX™ raportează valorile Ct și curbele de amplificare pentru fiecare canal detector al fiecărei probe testate, în felul următor:

- valoarea Ct de 0 indică faptul că nu a existat o valoare Ct calculată de către software cu pragul specificat (consultați Tabelul 2). Curba de amplificare a probei care arată o valoare Ct „0” trebuie să fie verificată manual.
- valoarea Ct de -1 indică faptul că nu a avut loc niciun proces de amplificare.
- orice altă valoare Ct trebuie interpretată în corelație cu curba de amplificare și conform îndrumărilor de interpretare a probei, expuse în Tabelul 5.

Verificați semnalul de control intern pentru a verifica corecta funcționare a amestecului de amplificare. În plus, verificați dacă există o raportare de defecțiune a BD MAX™ System.

-Rezultatele trebuie să fie citite și analizate folosind următorul tabel:



gena SARS-CoV-2 S (475/520)	Control intern (530/565)	Interpretare
-	+	ARN genă SARS-CoV-2 S nedetectată
+	+/-	ARN genă SARS-CoV-2 S detectată
-	-	Rezultat Nerezolvat (UNR) obținut în prezența inhibitorilor din reacția PCR sau când intervine o problemă generală (neraportată printr-un cod de eroare) în legătură cu etapele de procesare a probei și/sau amplificare.
IND	IND	Rezultat test Nedeterminat (IND) Datorat defectării BD MAX™ System. Rezultat al testului afișat în caz de defectare a instrumentului, asociată unui cod de eroare.
INC	INC	Rezultat test Incomplet (INC). Datorat defectării BD MAX™ System. Rezultat al testului afișat în caz de eșec la finalizarea rulării.

Tabelul 5 Interpretarea probei

+: A avut loc amplificarea

-: Nu a avut loc amplificarea

O probă este considerată pozitivă dacă valoarea Ct obținută este mai mică de 40. Controlul intern poate sau nu să arate un semnal de amplificare deoarece un număr înalt de copii a țintei poate cauza amplificarea preferențială a acizilor nucleici specifici țintei în locul controlului intern. În aceste cazuri, detectarea IC nu este necesară.

O probă este considerată negativă dacă proba nu prezintă niciun semnal de amplificare în sistemul de detecție, dar controlul intern este pozitiv. O inhibare a reacției PCR poate fi exclusă de amplificarea controlului intern.

În cazul rezultatelor nerezolvate (UNR), în absența semnalului controlului intern în proba negativă se recomandă repetarea testului cu o diluare 1:10 a probei pentru a verifica existența unor posibile probleme de inhibare.

Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.

10. Limitările testului

- Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.
- Deși testul poate fi utilizat cu alte tipuri de probe, acesta a fost validat cu tampoane nasofaringiene/orofaringiene recoltate în VTM.
- Calitatea testului depinde de calitatea probei; trebuie să fie extras acid nucleic de calitate din probele respiratorii.
- Pot fi detectate nivele extrem de joase ale țintei, aflate sub limita de detectare, însă rezultatele ar putea să nu fie reproductibile.



- Există o posibilitate de rezultate fals pozitive datorită contaminării încrucișate de la probele suspecte de SARS-CoV-2 conținând concentrații înalte de ARN țintă sau contaminării datorate produselor PCR provenite de la reacții efectuate anterior.
- Combinația specifică de primer și sondă pentru detectarea genei S utilizată în VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, destinată pentru detectarea SARS-CoV-2, nu prezintă omologii combinate semnificative cu genomul uman, microflora umană, SARS-CoV sau alți coronavirusi, care ar putea conduce la rezultate fals pozitive predictibile.
- Rezultatele fals negative pot apărea datorită mai multor factori și combinațiilor dintre aceștia, incluzând:
 - Metode necorespunzătoare de recoltare, transport, depozitare și/sau manipulare a probelor.
 - Proceduri necorespunzătoare de procesare (inclusiv de extracție a ARN).
 - Degradarea ARN viral în cursul transportului/depozitării și/sau procesării probei.
 - Mutațiile sau polimorfismele în regiunile de legare ale primerului sau sondei pot afecta detectarea variantelor de SARS-CoV-2 noi sau necunoscute.
 - O încărcare virală a specimenului sub limita de detectare a testului.
 - Prezența inhibitorilor RT-qPCR sau a altor tipuri de substanțe interferente. Nu a fost evaluat impactul vaccinurilor, agenților de terapie antivirală, antibioticelor, chimioterapeuticelor sau medicamentelor imunosupresoare utilizate pentru prevenirea COVID-19 sau utilizate în cursul tratamentului infecției.
 - Nerespectarea instrucțiunilor de utilizare lu a procedurii de testare.
- Rezultatele negative nu exclud infecția cu SARS-CoV-2 și nu trebuie utilizate ca unică bază pentru deciziile de tratament sau de gestionare a pacientului. Tipurile optime de probe și reperele de timp pentru nivelurile virale maxime în cursul infecției cauzate de SARS-CoV-2 nu au fost determinate. Poate fi necesară recoltarea de probe multiple (ca tipuri și repere de timp) de la același pacient, pentru a detecta virusul.
- Dacă testele diagnostice pentru alte boli respiratorii sunt negative și prezentarea clinică a pacientului, împreună cu informațiile epidemiologice, sugerează că este posibilă infecția cu SARS-CoV-2, trebuie luate în considerare existența unui rezultat fals negativ și retestarea pacientului.
- Un rezultat negativ nu exclude prezența ARN-ului virusului SARS-CoV-2 într-o probă clinică. Dacă observațiile clinice, antecedentele pacientului și informațiile epidemiologice sugerează infecția cu SARS-CoV-2, trebuie luată în considerare retestarea cu un volum crescut al probei.
- În cazul în care se obțin rezultate Nerezolvat, Nedeterminat sau Incomplet folosind VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, va fi necesară retestarea. Rezultatele Nerezolvat s-ar putea datora prezenței inhibitorilor în probă sau unei incorecte rehidratări a tubului cu amestec de reacție liofilizat. În cazul unei defecțiuni a instrumentului, vor fi obținute rezultatele Nedeterminat sau Incomplet.

11. Controlul de calitate

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit conține în fiecare tub de reacție un control intern (IC), care confirmă aplicarea corectă a tehnicii.



12. Caracteristici de performanță

12.1. Sensibilitate și specificitate clinică

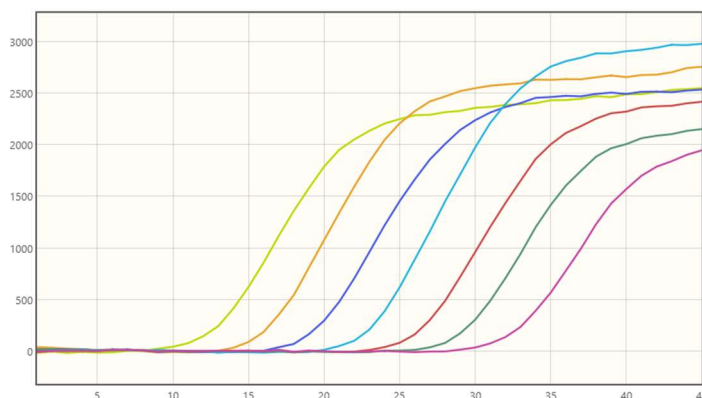
Performanța clinică a VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit a fost testată folosind 4 acizi nucleici izolați din tampoane nasofaringiene și/sau orofaringiene pozitive, recoltate în VTM, și 15 probe respiratorii (tampoane nasofaringiene și/sau orofaringiene în VTM) de la pacienți cu suspiciune clinică de boală COVID-19 sau alte boli respiratorii similare. Au fost constatate patru (4) probe SARS-CoV-2 pozitive și aceste rezultate au fost în acord cu un test PCR dezvoltat în conformitate cu recomandările CDC din China pentru primeri și sonde, pentru detectarea 2019-nCoV. În plus, cele 4 probe pozitive pentru SARS-CoV-2 au fost confirmate utilizând o metodă de detecție moleculară conform Centrului național de referință spaniol (Institutul de sănătate Carlos III (ISCIII)) (protocolul „2019-nCoV by real-time RT-PCR” (2019-nCoV în RT-PCR în timp real) sugerat de Charité (Berlin), cu modificări).

În concluzie, rezultatele indică o sensibilitate și o specificitate înaltă la detectarea SARS-CoV-2 utilizând VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilitate analitică

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit are o limită de detectare de ≥ 24 copii cADN per reacție (cp/rxn) cu o rată pozitivă de $\geq 95\%$.

Figura 2. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale genei SARS-CoV-2 S (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn) pe sistemul BD MAX™ (canal 475/520 (FAM)).



12.3. Specificitate analitică

Specificitatea testului pentru gena SARS-CoV-2 S a fost confirmată prin testarea unui panel constând din diverse microorganisme reprezentând cei mai frecvenți patogeni din domeniul respirator. Nu a fost detectată nicio reactivitate încrucișată între oricare dintre următoarele microorganisme testate:



Testarea reactivității încrucișate					
Adenovirus uman tipurile 1-5, 8, 15, 31, 40 și 41	-	Virus gripal A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Bocavirus uman	-	Virus gripal A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus gripal A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus gripal A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus gripal A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	Metapneumovirus uman A și B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus gripal A/Elveția/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus gripal A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipul A și C	-	Virus gripal A/Australia de sud/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Virus gripal A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Virusi paragripali 1, 2, 3 și 4 umani	-
Coronavirus 229E, OC43, NL63 și HKU1 uman	-	Virus gripal A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipul A1 și g885652	-
Coronavirus MERS	-	Virus gripal B/Brisbane/60/2008	-	Rinovirus uman tip C	-
Coronavirus SARS tulpina Frankfurt 1	-	Virus gripal B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Virus gripal B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus gripal A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus respirator sincițial (RSV) A și B	-

Tabelul 6 Microorganisme patogene de referință utilizate în acest studiu.

12.4. Reactivitate analitică

Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit a fost evaluată în raport cu ARN de la tulpina Human 2019-nCoV BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, tulpina Human 2019-nCoV 2019-nCoV/Italy-INMI1, controale de ARN sintetic pentru două variante de virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (izolat SARS-CoV2 Australia/VIC01/2020) și MN908947.3 (izolat SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1), prezentând rezultat pozitiv.

13. Bibliography/Bibliografie

- 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.
- World Health Organization. MERS situation update. December 2019. Available from <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1> Accessed March 2020.
- Chen N. *et al.* Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Actualizado a 27 de febrero de 2020. Available from https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf Accessed March 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. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed March 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 January 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed March 2020.
10. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Available from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> Accessed March 2020.
11. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Interim guidance. 27 February 2020. Available from [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)) Accessed March 2020.

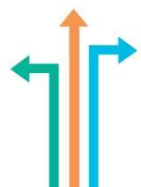
14. Symbols for IVD components and reagents/Simboluri pentru componentele și reactivii IVD

	In vitro diagnostic device Dispozitiv de diagnostic <i>in vitro</i>		Keep dry A se păstra la loc uscat		Use by Data de expirare		Manufacturer Producător		Batch code (Lot) Cod lot (Lot)
	Consult Instructions for Use Consultați instrucțiunile de utilizare		Temperature limitation Limite de temperatură		Contains sufficient for <n> test Conținut suficient pentru <n> teste		Sample diluent Diluent probă		Catalog number Număr catalog

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



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC