

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

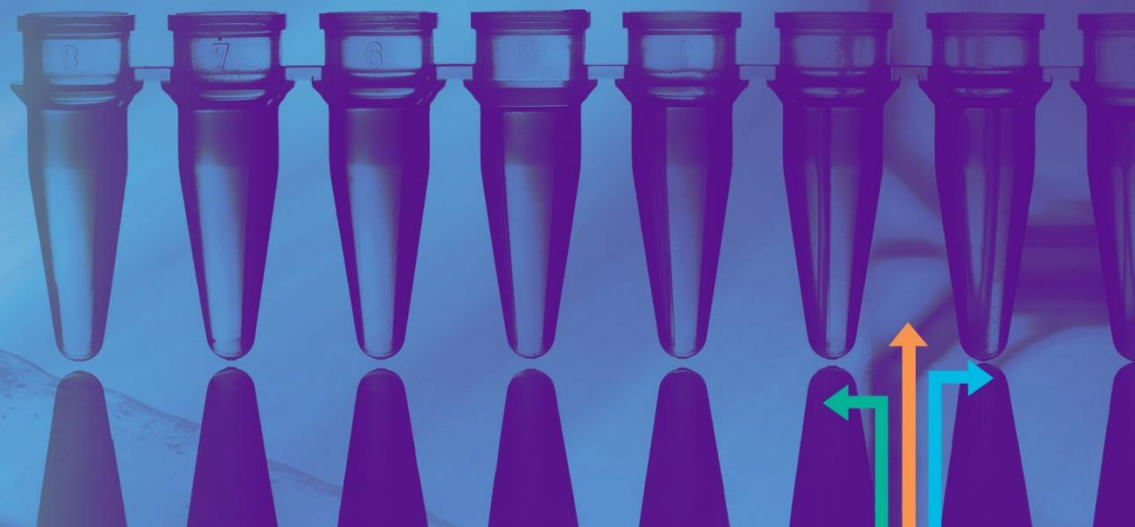
SARS-CoV-2 (N1 + N2)

Handbook for the following references/
Podręcznik dotyczy urządzeń z poniższymi kodami:

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

NR. REF. BD 444215

to be used with the BD MAX™ System
do stosowania razem z systemem BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from the SARS-CoV-2 in respiratory samples from individuals suspected of COVID-19 by their healthcare provider. This test is intended to be used as an aid in the identification of the presence of the SARS-CoV-2 viral RNA. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from respiratory specimens, amplified using RT-PCR and 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 [1,6,7,8]. 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 or chills, cough, fatigue, anorexia, myalgia and dyspnea [1,4,6,9]. Less common symptoms are sore throat, nasal congestion, headache, diarrhea, nausea and vomiting [1,4]. Loss of smell (anosmia) or loss of taste (ageusia) preceding the onset of respiratory symptoms has also been reported [9]. Older adults and people who have severe underlying medical conditions like heart or lung disease or diabetes seem to be at higher risk for developing more serious complications from COVID-19 illness [10].

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 [1,11]. Several assays that detect the SARS-CoV-2 have been are currently available, such as China CDC (gene targets, *ORF1ab* and *N*), *Charité* – Germany (gene targets, *RdRP* and *E*) or US CDC (two targets in *N* gene) [12].

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) specimens collected



mainly by a healthcare provider) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 [11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [11,12].

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System 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 tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of two conserved regions of N gene (N1 and N2) using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System 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 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous Internal Control (IC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels. N2 target is amplified and detected in channel 475/520, N1 target in channel 630/665 and the endogenous internal control (IC) in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color/Barcode	Amount
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Transparent Green or 1G foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange or 11 foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°: VS-NCO324 (444215).



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 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- 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 can be used 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 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, 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. Procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been validated on nasopharyngeal/ oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) Vircell S.L., Spain).

Other 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 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 400 and 750 µL of nasopharyngeal/ oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) or in BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media 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 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) 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 Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 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 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 N2 target	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Endogenous IC	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 N1 target	80	150	0	40
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	-	3.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	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	-
			61.1	63°C	✓

Table 4. PCR protocol.

11) Click the “Save Test” button.

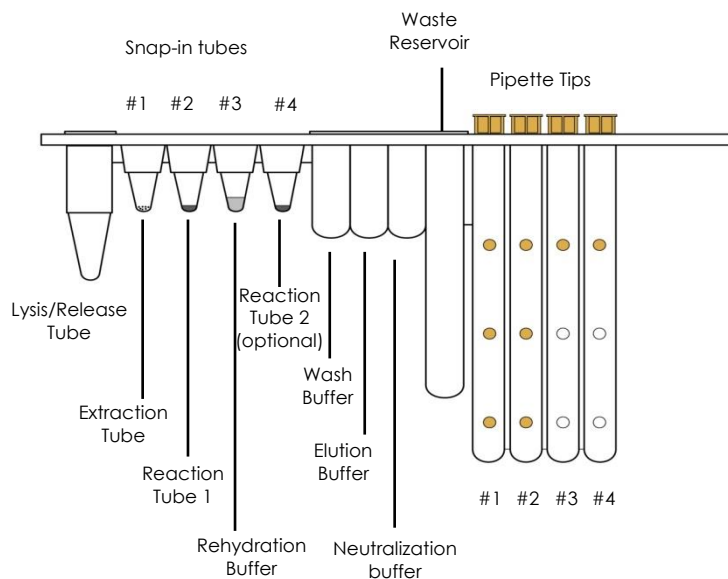
8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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 pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (green or 1G 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. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - 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 or 11 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. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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 (N1 + N2) (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 (N2 target) (475/520)	Endogenous Internal Control (530/565)	SARS-CoV-2 (N1 target) (630/665)	Interpretation
+	+/- ¹	+	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ¹
+ ²	+/- ¹	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ^{1,2}
-	+ ³	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected ³
-	- ³	-	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. ³
IND	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	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

1 A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The endogenous Internal Control (IC) may or may not show an amplification signal. Sometimes, the IC detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 If only one target site of the N gene amplifies, verify the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. In case of a doubtful interpretation, depending on the available material, it is also recommended to:

- re-extract and re-test another aliquot of the same specimen (if possible, increase sample volume to 750 µl) or,
- obtain a new specimen and re-test.

3 In the case of SARS-CoV-2 target sites negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the endogenous Internal Control, the result is considered as 'Unresolved', and retesting is required.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

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.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- 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, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of conserved regions of *N* gene used in VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System have been designed based on the US CDC assay for specific detection of SARS-CoV-2 by amplifying two unique regions of the *N* gene. They 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.
- A single-target site amplification or even random positive results is suggestive of slightly different amplification yield of the target site of the *N* gene. Samples with low viral load might result in *N* single target amplification. In case of a doubt, it is recommended referring to a reference laboratory for further testing.



- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences (*N* genes).
- 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.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System 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 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an endogenous 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 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using 254 respiratory samples (nasopharyngeal swabs in Vircell Transport medium) from patients with clinical suspicion of COVID-19 disease or other similar respiratory diseases. The retrospective-comparative analysis was performed with VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real time PCR Kit for BD MAX™ System and these results were compared with those obtained with the clinical diagnosis performed with Simplexa™ COVID-19 Direct assay with discrepant analysis performed with the Charité protocol.

VIASURE SARS-CoV-2 (<i>N1 + N2</i>) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	Alternative RT-PCR assays		
		+	-
+	63	2*	65
-	0	189	189
Total	63	191	254

Table 6. Comparative results for SARS-CoV-2.

*Initial diagnose of one of the two samples was invalid and reported to the patient as positive for prevention and quarantine period.



VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real time PCR Kit for BD MAX™ System detected two positive samples that were not detected using Simplexa™ COVID-19 Direct assay and the Charité protocol.

The Positive Percent Agreement (PPA) and the Negative Percent Agreement (NPA) for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR detection Kit for BD MAX™ System are >99% and 98%, respectively.

Results show high agreement to detect SARS-CoV-2 using VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit of ≥ 5 genome copies per reaction with a positive rate of $\geq 95\%$.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

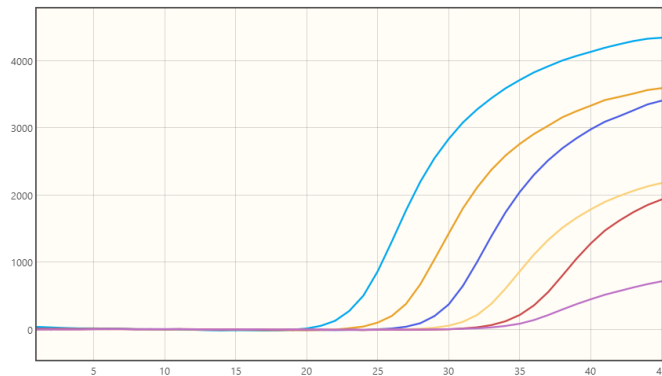
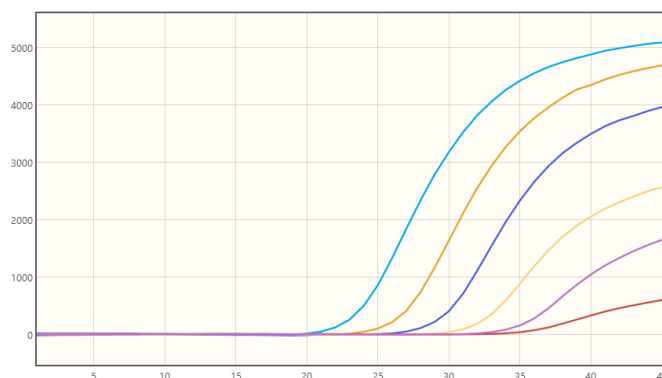


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 (N1 + N2) 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/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human rhinovirus type C	-
MERS Coronavirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 11 and 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, 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.



POLSKI

1. Przeznaczenie

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System to automatyczny test RT-PCR czasu rzeczywistego przeznaczony do jakościowego wykrywania RNA wirusa SARS-CoV-2 w pochodzących z układu oddechowego próbkach pobieranych od osób z podejrzeniem choroby COVID-19. Ten test jest przeznaczony do wspomaganie identyfikacji obecności RNA wirusa SARS-CoV-2. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ do zautomatyzowanej ekstrakcji RNA, a następnie- RT- PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™. RNA jest wyodrębniane z próbek pochodzących z układu oddechowego, amplifikowane w toku reakcji RT-PCR i wykrywane za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla wirusa SARS-CoV-2.

2. Streszczenie i objaśnienia

Koronawirusy to wirusy otoczkowe, zawierające niesegmentowaną nić RNA o dodatniej polaryzacji, należące do rodziny *Coronaviridae* [1,2]. Znanych jest sześć gatunków koronawirusów powodujących choroby ludzi [2]. Cztery wirusy (229E, OC43, NL63 and HKU1) powodują objawy przeziębienia, a pozostałe dwa (koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, SARS-CoV) oraz koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego, MERS-CoV) są wirusami zoonotycznymi i dają cięższe powikłania [2]. SARS-CoV i MERS-CoV spowodowały w sumie ponad 10 000 zgonów, przy wskaźnikach śmiertelności równych 34% dla MERS-CoV i 10% dla SARS-CoV [1,3].

W grudniu 2019 r. niektóre osoby pracujące lub mieszkające wokół targu owoców morza Huanan w mieście Wuhan, prowincji Hubei w Chinach, zgłaszały się z zapaleniem płuc o nieznannej przyczynie [2,4]. Analiza głębokiego sekwencjonowania próbek pobranych z dróg oddechowych wskazała na obecność nowego koronawirusa, który najpierw otrzymał nazwę nowy koronawirus 2019 (2019-nCoV), a ostatnio — SARS-CoV-2 [5].

Potwierdzono transmisję wirusa SARS-CoV-2 między ludźmi, nawet w okresie inkubacji bez występowania objawów przedmiotowych. Wirus ten powoduje ciężką chorobę układu oddechowego podobną do choroby wywołanej przez SARS-CoV [1,6,7,8]. Chociaż główną chorobą związaną z tym wirusem jest zapalenie płuc, u kilku pacjentów wystąpiło ciężkie zapalenie płuc., obrzęk płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej lub niewydolność wielonarządowa i zgon [1,4]. Ośrodki Zapobiegania i Zwalczania Chorób (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) stoją na stanowisku, że objawy SARS-CoV-2 mogą występować po 2-14 dniach po ekspozycji. Najczęstszymi objawami są gorączka lub dreszcze, kaszel, zmęczenie, utrata apetytu, bóle mięśni i duszność [1, 4, 6, 9]. Rzadszymi objawami są: ból gardła, nieżyt nosa, ból głowy, biegunka, nudności i wymioty [1, 4]. Zgłaszano również występowanie utraty węchu (anosmia) lub utraty smaku (ageuzja), co poprzedzało objawy ze strony układu oddechowego [9]. Dorosłe osoby w podeszłym wieku oraz osoby obciążone ciężkimi chorobami towarzyszącymi, takimi jak choroby serca, płuc czy cukrzyca wydają się być bardziej zagrożone rozwinięciem poważniejszych powikłań choroby COVID-19 [10].

Rozpoznanie SARS-CoV-2 opiera się na wczesnym wykrywaniu konwencjonalnych przyczyn zapalenia płuc oraz wykrywaniu za pomocą sekwencjonowania następnej generacji lub metod RT-PCR w czasie rzeczywistym [1,11].



Obecnie dostępnych jest kilka testów wykrywających SARS-CoV-2, takich jak Chińskie CDC (sekwencje docelowe genu *ORF1ab* i *N*), *Charité* — Niemcy (sekwencje docelowe genu *RdRP* i *E*) lub amerykańskie CDC (dwie sekwencje docelowe genu *N*) [12].

CDC zaleca pobieranie próbek z górnych dróg oddechowych (wymazy z jamy nosowo-gardłowej (NP, nasopharyngeal) oraz jamy ustnej i gardła (OP, oropharyngeal), wymaz z środkowej części małżowiny nosowej, wymaz z jamy nosowej, popłuczyny/aspirat jamy nosowo-gardłowej lub popłuczyny/aspirat z jamy nosowej pobierane głównie przez lekarza) i/lub dolnych dróg oddechowych (plwocina, aspirat z rurki dotchawiczej lub popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe w przypadku pacjentów z cięższą postacią choroby układu oddechowego) celem identyfikacji wirusa SARS-CoV-2 [11]. Dodatkowo w celu monitorowania obecności wirusa, można pobierać inne próbki kliniczne, takie jak krew, moczu i stolec [11,12].

3. Zasada oznaczania

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System jest przeznaczony do identyfikacji SARS-CoV-2 w próbkach z dróg oddechowych. Wykrywanie opiera się na jednoetapowym formacie oznaczania RT-PCR w czasie rzeczywistym, w którym odwrotna transkrypcja, następnie amplifikacja swoistych docelowych sekwencji odbywa się w tej samej probówce reakcyjnej. Docelowa sekwencja izolowanego RNA podlega transkrypcji za pomocą odwrotnej transkryptazy, generując komplementarne DNA, a następnie amplifikacji dwóch konserwatywnych regionów regionu genu *N* (*N1* i *N2*) przy użyciu swoistych starterów oraz sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnych.

Zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™.

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTPS, bufor, polimeraza, odwrotna transkryptaza) w postaci stabilizowanej oraz endogenną kontrolę wewnętrzną do monitorowania procesu izolacji i/lub hamowania aktywności polimerazy. Oznaczenie wykorzystuje ludzki gen porządkowy human jako endogenną kontrolę wewnętrzną (IC) (gen ludzkiej *RNazy P*). Ludzkie geny porządkowe biorą udział w podstawowych komórkowych czynnościach porządkowych i w związku z tym oczekuje się, że będą występować we wszystkich ludzkich komórkach jądrazastych oraz zachowywać względnie stałe poziomy ekspresji. Amplifikacja sekwencji docelowej genu *N2* i jej wykrywanie następuje w kanale 475/520, sekwencji docelowej genu *N1* w kanale 630/665, a endogennej kontroli wewnętrznej (IC) w kanale 530/565.

4. Dostarczane odczynniki

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w tabeli 1 :



Kod	Odczynnik/Materiał	Opis	Kolor/Kod kreskowy	Ilość
VS-NCO312	SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Mieszanka enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz endogennej kontroli wewnętrznej w formie stabilizowanym	Przezroczysta zielona folia lub folia 1G	2 woreczki po 12 próbek
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu	Przezroczysty pomarańczowa folia lub folia 11	1 woreczek po 24 próbki

Tabela 1. Odczynniki i materiały zawarte w zestawie VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System o nr kat. VS-NCO324 (444215).

5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (nr ref.:442827 lub 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (nr ref.: 437519)
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Końcówki z filtrem
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe

6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbki reakcyjne, można je użyć w ciągu maksymalnie 28 dni.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.



- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Przez cały czas należy unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do pipet wyporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki.
- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W miejscu przeprowadzania testu nie należy jeść, pić ani palić tytoniu. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, przetwarzania i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

8. Procedura

8.1. POBIERANIE, PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT PRÓBEK

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System został poddany walidacji w odniesieniu do wymazów z jamy nosowo-gardłowej/ jamy ustnej i gardła pobieranych na podłoża do transportu wirusów (VTM, Viral Transport Medium) (Vircell S.L., Hiszpania).

Inne rodzaje próbek z wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła na VTM muszą zostać zwalidowane przez użytkownika.



Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się w warunkach zwalidowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi powinien odbywać się w temperaturze 2–8°C zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 48 godziny) zalecamy przesyłanie w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Zaleca się używanie świeżych próbek do testu. Probki można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 48 godziny lub zamrożone w temperaturze -20°C lub idealnie -70°C w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.

8.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBK I EKSTRAKJA RNA

Przygotować próbkę zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkowania zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Pobrać pipetą 400–750 μl wymazu z jamy nosowo-gardłowej/ jamy ustnej i gardła pobranej na wirusowe podłoże transportowe (VTM) lub podłoże BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media i przenieść do probówki z buforem BD MAX™ TNA-3 i zamknąć probówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejsć do obsługi systemu BD MAX™.

8.3. PROTOKÓŁ PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Uwaga: Jeśli już utworzono test zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection, można pominąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ wybrać zakładkę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) Wpisać nazwę testu (tj. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2)) w oknie „Test Name” (Nazwa testu) na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje).
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” wybrać „Type 5”



- b. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla systemu BD MAX™. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)).
- 6) W „Sample extraction parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Definiowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do 950 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W zakładce „PCR settings”(Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 2).
- a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX™. W takiej sytuacji Ustawienia PCR i Etapy testu należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

Channel (Kanał)	Alias (Alias)	Gain (Wzmocnienie)	Threshold (Wartość progowa)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Sekwencja docelowa genu N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Endogenna kontrola wewnętrzna (IC)	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Sekwencja docelowa genu N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 2. Ustawienia PCR

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

- 9) Na karcie „PCR settings” (Ustawienia reakcji PCR) należy wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Przesłuch widmowy) (Tabela 3).

		False Receiving Channel (Falszywy kanał odbiorczy)				
Channel (Kanał)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-

Tabela 3. Parametry „Spectral cross-talk”

- 10) W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 4).



Step Name (Nazwa etapu)	Profile Type (Typ profilu)	Cycles (Cykle)	Time (s) (Czas(y))	Temperature (Temperatura)	Detect (Wykrywanie)
Reverse transcription (Odwrotna transkrypcja)	Wstrzymanie	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Wstępna denaturacja)	Wstrzymanie	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (Gromadzenie danych))	2- Temperatura	45	10	95°C	-
			61,1	63°C	✓

Tabela 4. Protokół PCR

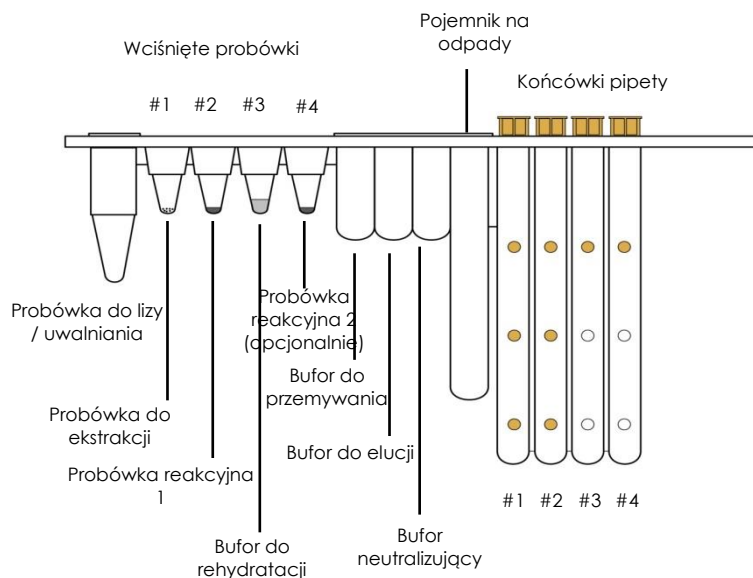
11) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).

8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- 1) Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden indywidualny pasek odczynnikowy z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3. Delikatnie uderzyć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie próbek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™.
- 2) Wyjąć potrzebną liczbę próbek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć próbkę (próbki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- 3) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę próbek reakcyjnych VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (zielona folia lub folia 1G) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1).
 - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbki i nie przylega do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
 - i. Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) (Punkt 8.3.1), należy określić i oddzielić odpowiednią liczbę dodatkowych próbek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
- 4) Wyjąć potrzebną liczbę próbek z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube (pomarańczowa folia lub folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
 - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie próbki i nie przylega do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że bufor znajduje się na spodzie próbki.



Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3.



8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać zakładkę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny próbki z buforem próbki do okna „Sample tube” (Probówka z próbką) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Worklist” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich próbek z buforem próbki. Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz probówki z buforem próbki zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną próbkę z buforem próbki w statywie (statywach) BD MAX™.
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge do systemu BD MAX™.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

8.3.5 Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).



- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...).
- 4) Kliknąć „Print or Export button” (Przycisk drukowania lub eksportu) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu).

9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 2). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 5.

Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™.

Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższej tabeli:



SARS-CoV-2 (sekwencja docelowa genu N2) (475/520)	Endogenna kontrola wewnętrzna (530/565)	SARS-CoV-2 (sekwencja docelowa genu N1) (630/665)	Interpretacja
+	+/- ¹	+	Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 ¹
+ ²	+/- ¹	-	Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	Wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 ^{1,2}
-	+ ³	-	Nie wykryto RNA genu N wirusa SARS-CoV-2 ³
-	- ³	-	Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji. ³
IND	IND	IND	Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Spowodowany awarią systemu BD MAX TM . Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.
INC	INC	INC	Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Spowodowany awarią systemu BD MAX TM . Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.

Tabela 5. Interpretacja próbek

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła

1 Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Endogenna kontrola wewnętrzna (IC) może wykazywać sygnał amplifikacji lub go nie wykazywać. Czasami wykrywanie kontroli wewnętrznej (IC) nie jest konieczne ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej.

2 Jeżeli dochodzi do amplifikacji tylko jednej sekwencji docelowej genu N, należy sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji. W razie wątpliwej interpretacji, w zależności od dostępnego materiału, zaleca się:

- ponownie wyizolować oraz przebadać inny alikwot tej samej próbki (w razie możliwości, zwiększając objętość próbki do 750 µl) lub,
- pozyskać nową próbkę i wykonać ponowne oznaczenie.

3 W przypadku ujemnego wyniku docelowych sekwencji wirusa SARS-CoV-2, sygnał amplifikacji kontroli wewnętrznej (IC) musi mieć wartość Ct mniejszą niż 35. Wartość Ct może być bardzo zmienna ponieważ endogenna kontrola wewnętrzna to ludzki gen porządkowy, który powinien występować we wszystkich ludzkich komórkach jądrazstych oryginalnej próbki. W przypadku braku sygnału lub wartości Ct endogennej kontroli wewnętrznej ≥ 35 , wynik należy uznać za Nierozstrzygający i konieczne jest ponowne wykonanie testu.

W przypadku ponownego uzyskania dwuznacznego wyniku zaleca się ponownie zapoznać się z instrukcją użycia i przeanalizować proces izolacji stosowany przez użytkownika w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania



każdego etapu reakcji RT-qPCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.

10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Chociaż ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranych na VTM.
- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
- Na ogół występujący na spodzie próbki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formie stabilnym (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego kwasu nukleinowego z próbek z dróg oddechowych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez SARS-CoV-2 którejkolwiek próbki zawierającej wysokie stężenia docelowej sekwencji RNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Specyficzne kombinacje starterów i sond do wykrywania konserwatywnych regionów genu *N* wykorzystane w zestawie VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zostały opracowane na podstawie oznaczenia amerykańskiej organizacji CDC do specyficznego wykrywania wirusa SARS-CoV-2 poprzez zamplikowanie dwóch unikatowych regionów genu *N*. Nie wykazuje znaczących kombinowanych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą, wirusem SARS-CoV ani innymi koronawirusami, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą wynikać z kilku czynników oraz ich kombinacji, w tym z powodu:
 - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod przechowywania próbek.
 - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym izolacji RNA).
 - degradacji wirusowego RNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
 - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania startera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych wariantów wirusa SARS-CoV-2.
 - wiremii w próbce poniżej granicy wykrywania testu.
 - obecności inhibitorów reakcji RT-qPCR albo innych typów substancji interferujących. Nie oceniano wpływu szczepionek, leków przeciwwirusowych, antybiotyków, chemioterapeutyków lub



immunosupresantów stosowanych w celu zapobiegania wystąpieniu choroby COVID-19 lub stosowanych w trakcie leczenia zakażenia.

- nieprzestrzegania instrukcji użycia i procedury przeprowadzania testu.
- Amplifikacja jednej sekwencji docelowej lub nawet losowy wynik dodatni sugeruje znacząco inny uzysk amplifikacji sekwencji docelowej genu *N*. W przypadku próbek o niskiej wirerii może dochodzić do amplifikacji jednej sekwencji docelowej genu *N*. W razie wątpliwości zaleca się przekazać materiał laboratorium referencyjnemu w celu wykonania dalszych badań.
- W przypadku niektórych próbek może nie dojść do uzyskania krzywej amplifikacji *RNazy P* z powodu niskiej liczby komórek ludzkich w oryginalnej próbce klinicznej. Ujemny wynik kontroli wewnętrznej (IC) nie wyklucza obecności RNA wirusa SARS-CoV-2 w próbce klinicznej.
- Wynik dodatni testu nie musi koniecznie oznaczać obecności żywych wirusów i nie sugeruje, że te wirusy są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność docelowych sekwencji wirusowych (genów *N*).
- Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia lub innego postępowania z pacjentem. Nie określono optymalnych rodzajów próbek ani czasu występowania maksymalnych stężeń wirusa w trakcie zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Do wykrycia wirusa może być konieczne pobranie wielu próbek (różne rodzaje i punkty czasowe) od tego samego pacjenta.
- Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób układu oddechowego są ujemne, a objawy kliniczne pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia wirusem SARS-CoV-2, wówczas należy wziąć pod uwagę wynik fałszywie ujemny i rozważyć ponowne wykonanie testu.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbówce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zawiera endogenną kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej próbówce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

12. Charakterystyka wydajnościowa

12.1. Czulość i swoistość kliniczna

Wydajność kliniczną zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System badano przy użyciu 254 próbek z dróg oddechowych (wymazów z jamy nosowo gardłowej pobranych na podłoże transportowe Vircell) od pacjentów z podejrzeniem klinicznym choroby COVID-19 lub innych podobnych chorób układu oddechowego. Przeprowadzono retrospektywną analizę porównawczą przy zastosowaniu zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System i wyniki te porównano z wynikami



uzyskanymi w drodze rozpoznania klinicznego za pomocą oznaczenia Simplexa™ COVID-19 Direct, a w przypadku rozbieżności przeprowadzono analizę zgodnie z protokołem Charité.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	Alternatywne oznaczenia RT-PCR			
		+	-	Ogółem
	+	63	2*	65
	-	0	189	189
	Ogółem	63	191	254

Tabela 6. Wyniki porównawcze dla wirusa SARS-CoV-2.

*Wstępne rozpoznanie dla jednej z dwóch próbek było nieważne i zostało zgłoszone pacjentowi jako wynik dodatni w celach zapobiegawczych i dla okresu kwarantanny.

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real time PCR Kit for BD MAX™ System wykryło dwie próbki dodatnie, które nie zostały wykryte przy użyciu oznaczenia Simplexa™ COVID-19 Direct i protokołu Charité.

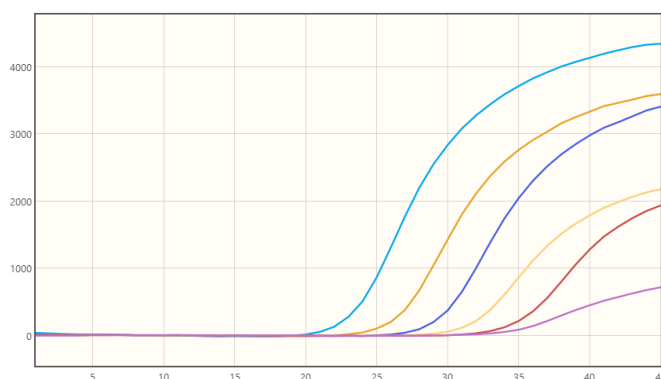
Zgodność wyników dodatnich (PPA, Positive Percent Agreement) i zgodność wyników ujemnych (NPA, Negative Percent Agreement) dla zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wyniosła odpowiednio >99% i 98%.

Wyniki wykazują wysoką zgodność w zakresie wykrywania SARS-CoV-2 przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

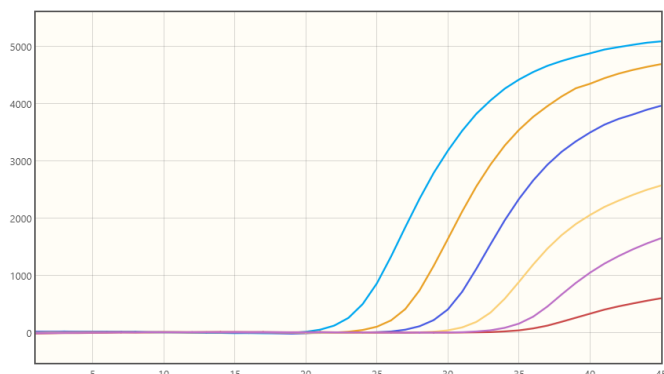
12.2. Czulość analityczna

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wykazuje ograniczenie wykrywania do ≥ 5 kopii genomu na reakcję ze wskaźnikiem wyników dodatnich wynoszącym $\geq 95\%$.

Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy wirusa SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \cdot 10^4$ - $9,9 \cdot 10^0$ i $5,0 \cdot 10^0$ kopii genomu na reakcję) w systemie BD MAX™ (kanał 475/520 (FAM)).



Rysunek 3. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy wirusa SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \cdot 10^4$ - $9,9 \cdot 10^0$ i $5,0 \cdot 10^0$ kopii genomu na reakcję) w systemie BD MAX™ (kanał 630/665 (Cy5)).



12.3. Swoistość analityczna

Swoistość oznaczenia SARS-CoV-2 (N1 + N2) potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów reprezentujących najczęściej występujące patogeny zakażeń dróg oddechowych. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów:

Badania reaktywności krzyżowej					
Ludzki Adenovirus typy 1-5, 8, 15, 31, 40 i 41	-	Wirus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Ludzki bokawirus	-	Wirus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Wirus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Wirus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Ludzki metapneumovirus A i B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Wirus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Wirus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Wirus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> szczep bez oporności na ryfampicynę	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A i C	-	Wirus Influenza A/Hongkong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Ludzkie wirusy paragrypy 1, 2, 3 i 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Wirus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> typ A1 i g885652	-
Ludzki koronawirus 229E, OC43, NL63 i HKU1	-	Wirus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Ludzki rinowirus typ C	-
Koronawirus MERS	-	Wirus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus szczep Frankfurt 1	-	Wirus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterowirus 68 i 71	-	Wirus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterowirus Echowirus 11 i 30	-	Wirus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterowirus wirus Cocksackie A24, A9 i B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych (RSV) A i B	-

Tabela 7. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.



12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System oceniano w odniesieniu do RNA z ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep 2019-nCoV/Italy-INMI1, wirusa SARS-CoV-2 szczep 2019nCoV/USA-WA1/2020, syntetycznych kontroli RNA dla dwóch wariantów wirusa SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 izolowany w Australia/VIC01/2020) oraz MN908947.3 (SARS-CoV-2 izolowany w Wuhan-Hu-1), uzyskując wyniki dodatnie.











13. Bibliography/Bibliografia

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed September 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. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed September 2020.
7. 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.
8. 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.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed September 2020.
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed September 2020.
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed September 2020.
12. Yan Y *et al.* Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed September 2020.



14. Chu D.K.W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed September 2020.
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
18. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. *et al.* Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.
20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance> Accessed September 2020.

14. Symbols for IVD components and reagents/ Symbole dla elementów i odczynników IVD

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Urządzenie do diagnostyki w warunkach in vitro</p>	 <p>Keep dry Przechowywać w suchym miejscu</p>	 <p>Use by Użyć przed</p>	 <p>Manufacturer Producent</p>	 <p>Batch code (Lot) Kod partii (seria)</p>
 <p>Consult Instructions for Use Sprawdzić w Instrukcji Użycia</p>	 <p>Temperature limitation Ograniczenie temperatury</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów</p>	 <p>Sample diluent Rozcieńczalnik próbek</p>	 <p>Catalog number Numer katalogowy</p>

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







CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC