

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



SARS-CoV-2 (N1 + N2)
for BD MAX™ System

CE IVD



These instructions for use apply to the following reference / *Ce mode d'emploi s'applique à la référence suivante :*

PRODUCT / PRODUIT	REFERENCE / REFERENCE
VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444215 / VS-NCO324

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / *Référence du produit à utiliser avec le système BD MAX™.*

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and RNA extraction.....	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	14
11.	Quality control.....	15
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	15
12.2.	Analytical sensitivity	17
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	18

Contenu

1.	Utilisation prévue	19
2.	Résumé et explication	19
3.	Procédé	20
4.	Réactifs fournis.....	20
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur.....	21
6.	Conditions de transport et de stockage	21
7.	Précautions pour les utilisateurs	21
8.	Procédure de test	23
8.1.	Prélèvement, stockage et transport des échantillons.....	23

8.2.	Extraction de l'ARN	23
8.3.	Protocole PCR	24
9.	Interprétation des résultats	28
10.	Limitations du test	29
11.	Contrôle qualité	31
12.	Caractéristiques de performance	31
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques	31
12.2.	Sensibilité analytique	32
12.3.	Spécificité analytique	33
12.4.	Réactivité analytique	34
	Bibliography/ Bibliographie	35
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs	36
	Trademarks	36

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 nasopharyngeal/oropharyngeal swab and saliva samples from individuals suspected of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of COVID-19 in combination with clinical and epidemiological risk factors. 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 specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and 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 COVID-19 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 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) and saliva

specimens collected mainly by a healthcare professional) 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 qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2 in nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and saliva 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.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2	475/520	N gene (N2 region)
SARS-CoV-2	630/665	N gene (N1 region)
Endogenous Internal Control (IC)	530/565	human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

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 2:

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

Table 2. 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. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. 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 (BD MAX™ PCR Cartridge).
- 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, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- 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 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal/ oropharyngeal swabs collected in viral transport media (VTM) (Vircell S.L., Spain); nasopharyngeal swabs collected in BD™ UVT System media, Virus transport and preservation medium (Biocomma®), UTM Viral transport (COPAN, Diagnostic Inc.), sterile transport medium (Deltalab®), Universal transport medium (UTM) and IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) from Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; and saliva samples collected in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory and saliva 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 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at ≤-20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 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.

The nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and saliva specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection

guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> and Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018)). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

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.

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

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.

In case of using saliva samples collected in transport media:

1. Saliva samples may be collected in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT), or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) at a ratio of 1:3 (saliva:media). Vortex for 1 minute at high speed. Pipette 750 µL 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.

In case of using neat saliva samples:

1. Combine saliva with Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT), or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) so that the final ratio of saliva:media is 1:3. Vortex for 1 minute at high speed. Then pipette 750 µL 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 test for the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, 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) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: 1G (concerning SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - 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-In 2 (green) and Snap-In 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 3. 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.

- 10) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 4), as well.

		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
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 4. Spectral cross-talk parameters.

11) In “Test Steps” tab, enter the PCR protocol (Table 5).

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	✓

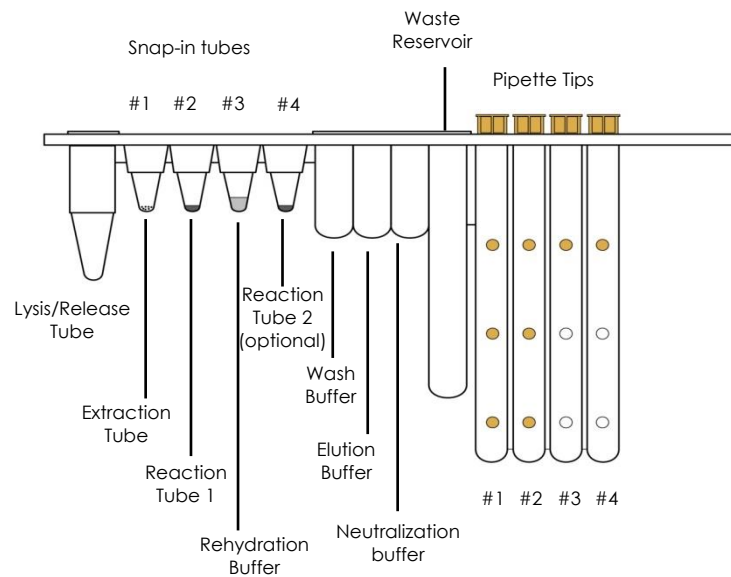
Table 5. PCR protocol.

12) 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 SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (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 (1I 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 Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List 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 3). 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 6.

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 6. 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:

- a) re-extract and re-test another aliquot of the same specimen (if possible, increase sample volume to 750 µl) or,
- b) 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 and oropharyngeal swabs and saliva samples, both 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 sites 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 if clinically indicated.
- 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 respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs and oropharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	nasopharyngeal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	“Servicio de Microbiología” of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	nasopharyngeal swab	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Table 7. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity values for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	Simplexa™ COVID-19 Direct assay	SARS-CoV-2	63	189	2	0	100% (94-100)	99% (96-99)
	Cobas® SARS-CoV-2 real time RT-PCR test	SARS-CoV-2	16	58	2	0	100% (79-100)	96% (88-99)
	Allplex™2019-nCoV Assay	SARS-CoV-2	71	75	0	0	100% (94-100)	100% (95-100)
2	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	SARS-CoV-2	99	0	0	0	100% (96-100)	n.a*

Table 8. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Due to the fact that negative samples were not analyzed, the calculation of the specificity of the test could not be performed.

In order to evaluate the compatibility of different sample matrices (nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab and nasopharyngeal/oropharyngeal swab in VTM from Vircell), a compatibility study have been carried out. The obtained results showed that the three different sample matrices were compatible with the SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

The performance of VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with saliva samples was evaluated. Negative saliva single samples spiked with a known concentration of frozen quantified heat-inactivated culture 2019 Novel Coronavirus, Strain:2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK) were tested. The evaluation was designed to be carried out with 30 positive samples (20 samples 2 times LoD (2xLoD), equivalent to 0.53 genome copies (GC)/μL, and 10 samples 5 times LoD (5xLoD) equivalent to 1.32 genome copies (GC)/μL) and 10 negative samples. This assay was performed using a 750 μl sample volume of each condition added in the Sample Buffer Tube (SBT) of the TNA-3 Extraction Kit and it was run in full process mode (Automated extraction and PCR amplification) using BD MAX™ ExK™ TNA-3.

The percentage of agreement was calculated in relation to the expected result for each individual sample and results are showed in the following table.

Saliva sample	Agreement
Positive sample (2xLoD)	97.5%
Positive sample (5xLoD)	100%
Negative sample	100%

Table 9. Percentage of agreement of VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with saliva samples.

In conclusion, saliva samples were compatible with VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

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 on nasopharyngeal swabs and ≥ 10 genome copies per reaction on saliva samples with a positive rate of $\geq 95\%$.

Note: The detection limit on saliva samples has been calculated using a sample volume of 750 μ L (dilution 1:3 in VTM).

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).

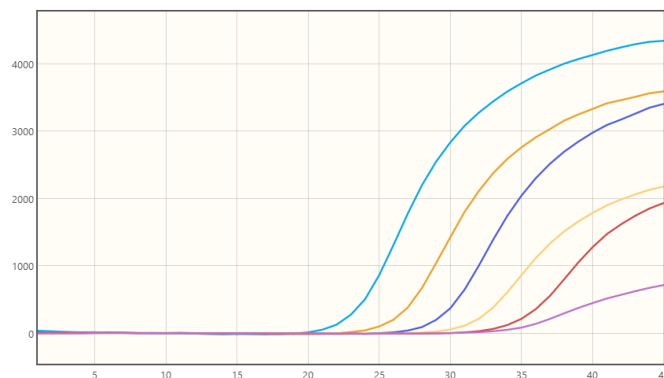
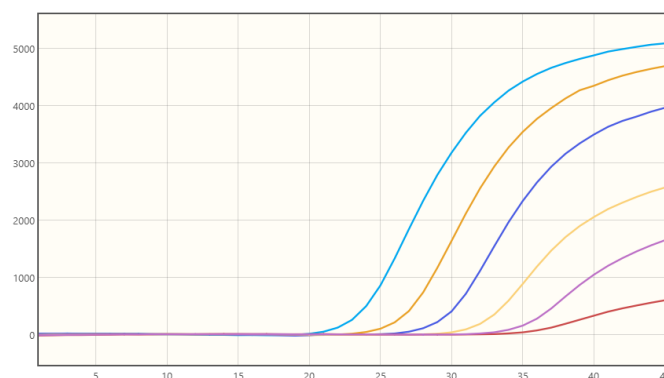


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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/Reihenente/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 10. 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, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER and synthetic RNA controls for four variants of the SARS-CoV-2 virus: SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, B.1.1.7_710528 and B.1.1.7_601443, showing positive results.

FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test RT-PCR automatisé en temps réel conçu pour la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les échantillons nasopharyngés/oropharyngés et la salive de personnes suspectées de Coronavirus 2019 (COVID-19) par leur prestataire de soins de santé. Ce test est destiné à faciliter le diagnostic de COVID-19 en combinaison avec des facteurs de risque cliniques et épidémiologiques. Le test utilise le BD MAX™ System pour l'extraction automatisée de l'ARN, puis la méthode RT-PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés avec des réactifs universels et consommables pour le BD MAX™ System. L'ARN est extrait des échantillons et l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé et amplifié par RT-PCR, puis détecté au moyen de sondes fluorescentes à colorant rapporteur spécifiques pour le SARS-CoV-2.

2. Résumé et explication

Les coronavirus sont des virus enveloppés dont le génome est une molécule d'ARN de polarité positive non segmentée. Ils appartiennent à la famille des *Coronaviridae* [1,2]. Six espèces de coronavirus sont connues pour causer des maladies chez l'homme [2]. Quatre virus (229E, OC43, NL63 et HKU1) provoquent des symptômes de rhume courants et les deux autres [coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)] sont zoonotiques et entraînent des complications plus graves [2]. SARS-CoV et MERS-CoV ont causé plus de 10 000 cas cumulés ces vingt dernières années, avec des taux de mortalité de 34 % pour MERS-CoV et de 10 % pour SARS-CoV [1,3].

En décembre 2019, des personnes qui travaillaient au marché de poissons de Huanan à Wuhan, province de Hubei, en Chine, ou qui habitaient à proximité, ont contracté une pneumonie d'origine inconnue [2,4]. Une analyse approfondie du séquençage des échantillons respiratoires a révélé un nouveau coronavirus, appelé dans un premier temps le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV), puis SARS-CoV-2 [5].

La transmission d'homme à homme du SARS-CoV-2 a été confirmée, même pendant la période d'incubation sans symptômes. Le virus provoque des pathologies respiratoires graves comme dans le cas du SARS-CoV [1,6,7,8]. Bien que la pneumonie constitue la principale maladie associée, quelques patients ont développé une forme de pneumonie plus grave, un œdème pulmonaire, le syndrome de détresse respiratoire aiguë ou une défaillance multiviscérale et sont décédés [1,4]. Selon les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention ou CDC), les symptômes du SARS-CoV-2 peuvent se manifester dans les 2 jours et jusqu'à 14 jours après l'exposition, et sont, pour les plus fréquents : fièvre ou frissons, toux, fatigue, anorexie, myalgie et dyspnée [1,4,6,9], et pour les moins fréquents : mal de gorge, congestion nasale, maux de tête, diarrhée, nausées et vomissements [1,4]. La perte de l'odorat (anosmie) ou la perte du goût (agueusie) précédant l'apparition des symptômes respiratoires a également été observée [9]. Les personnes âgées et celles présentant des pathologies graves sous-jacentes, comme une maladie cardiaque ou pulmonaire ou le diabète, semblent courir un risque plus élevé de développer des complications plus graves liées à la COVID-19 [10].

Le diagnostic du COVID-19 est réalisé par la détection des causes classiques de la pneumonie de manière précoce et par des méthodes de séquençage nouvelle génération ou RT-PCR en temps réel [1,11]. Plusieurs tests

de dépistage du SARS-CoV-2 sont actuellement disponibles, notamment : CDC Chine (cibles génétiques, *ORF1ab* et *N*), *Charité* – Allemagne (cibles génétiques, *RdRP* et *E*) ou CDC États-Unis (deux cibles dans le gène *N*) [12].

Le CDC recommande d'utiliser des échantillons provenant des voies respiratoires supérieures (écouvillons nasopharyngés [NP] et oropharyngés [OP], écouvillon du cornet nasal moyen, écouvillon nasal, lavage/aspiration nasopharyngé/e ou lavage/aspiration nasal/e [NW] et échantillon de salive prélevés principalement par un prestataire de santé) et/ou des voies respiratoires inférieures (expectorations, aspirat endotrachéal ou fluides de lavage bronchoalvéolaire chez les patients présentant une pathologie respiratoire plus grave) pour l'identification du SARS-CoV-2 [11]. Par ailleurs, d'autres échantillons cliniques (sang, urine et selles) peuvent être prélevés pour surveiller la présence du virus [11,12].

3. Procédé

Le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est conçu pour la détection qualitative de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les échantillons nasopharyngés/oropharyngés et la salive. La détection se fait en une seule étape par RT-PCR en temps réel au cours de laquelle la transcription inverse et l'amplification ultérieure de la séquence cible spécifique se produisent dans le même tube réactionnel. La cible ARN isolée est transcrite, générant de l'ADN complémentaire par transcriptase inverse qui est suivie par l'amplification de deux zones conservées du gène *N* (*N1* et *N2*) au moyen d'amorces spécifiques et de sondes marquées d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le système BD MAX™.

Le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPs, tampon, polymérase, transcriptase inverse) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne endogène pour surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase. Le test utilise un gène domestique humain comme contrôle interne (CI) endogène (gène *RNase P* humain). Les gènes domestiques humains sont impliqués dans la maintenance des cellules de base et, par conséquent, sont censés être présents dans toutes les cellules humaines nucléées et maintenir des niveaux d'expression relativement constants.

Cible	Canal	Gène
SARS-CoV-2	475/520	gène <i>N</i> (Région <i>N2</i>)
SARS-CoV-2	630/665	gène <i>N</i> (Région <i>N1</i>)
Contrôle interne (CI) endogène	530/565	gène <i>RNase P</i> humain

Tableau 1. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 2 ci-après.

Réactif/matériau	Description	Code-barres	Quantité
SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces, des sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne endogène dans un format stabilisé	Opercule 1G	2 poches de 12 tubes transparents
Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule 11	1 poche de 24 tubes transparents

Tableau 2. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, réf. N° VS-NCO324 (444215).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement qui sont indispensables, mais qui ne sont pas inclus dans le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR en temps réel : BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (réf. :442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (réf. : 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.
- La durée d'utilisation des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels est de 28 jours maximum après ouverture.

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- Ne pas utiliser de réactifs et/ou de matériaux périmés.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.
- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.

- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le BD MAX™ System ne sont pas contaminés. Évitez à tout moment tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, boire, fumer ou appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et matériau ayant été exposé à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux et / ou bio-dangereux, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, la manipulation et l'élimination des échantillons.
- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les kits « VIASURE Real Time PCR Detection Kits » ne nécessitent pas de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) en raison de leur classification comme non dangereux pour la santé et l'environnement, car ils ne contiennent aucune substance et/ou mélange qui répondent aux critères de classification des dangers disponibles dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou qui se trouvent à des concentrations supérieures à la valeur établie dans le règlement mentionné pour leur déclaration.
- Consultez le manuel de l'utilisation du système BD MAX™ pour en savoir plus sur les avertissements, précautions et procédures à respecter.

8. Procédure de test

8.1. Prélèvement, stockage et transport des échantillons

Le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été validé sur des écouvillons nasopharyngés/oropharyngés prélevés dans un milieu de transport viral (VTM) (Vircell S.L., Espagne), des écouvillons nasopharyngés prélevés dans un milieu recueillis dans un BD™ UVT System media, un milieu de transport et de conservation viral (Biocomma®), un UTM Viral transport (COPAN, Diagnostic Inc.), un milieu de transport stérile (Deltalab®), un milieu de transport universel (UTM) et un IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) de Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, ainsi que des échantillons de salive recueillis dans un Viral Transport Medium (VTM), un BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou un IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

Les échantillons prélevés, stockés et transportés doivent être conservés selon les conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires et la salive doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 72 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 72 heures), nous recommandons une expédition à ≤-20 °C ou moins. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons nasopharyngés/oropharyngés et de salive doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons, site web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> et directives provisoires pour le prélèvement, la manipulation et le test d'échantillons cliniques COVID-19. Site web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018)). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Extraction de l'ARN

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Veuillez noter qu'un prétraitement peut s'avérer nécessaire pour certains échantillons. L'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application.

Lors de l'utilisation d'échantillons nasopharyngés ou oropharyngés :

1. Pipettez entre 400 et 750 µl de l'écouvillon nasopharyngé/oropharyngé prélevé dans un milieu de transport viral (VTM) ou BD™ Universal Viral Transport (UVT) System dans un BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube et

fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le système BD MAX™.

En cas d'utilisation d'échantillons de salive collectés dans des supports de transport :

1. Les échantillons de salive peuvent être prélevés dans le milieu de transport viral (VTM), le BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou le IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) à un ratio de 1:3 (salive:milieu). Mélangez l'échantillon au vortex pendant 1 minute. Pipettez 750 µl dans un BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System.

En cas d'utilisation d'échantillons de salive NEAT :

1. Combinez la salive avec le milieu de transport viral (VTM), le BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou le IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) afin d'obtenir un ratio final de 1:3 (salive:milieu). Mélangez l'échantillon au vortex pendant 1 minute. Puis, pipettez 750 µl dans un BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System.

8.3. Protocole PCR

Remarque : veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™ pour obtenir des instructions détaillées.

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Remarque : si vous avez déjà créé le test pour VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : notamment, VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Type 5 »
 - a. Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX™, dans ce cas sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation).
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 950 µl.
- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).

- 8) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes-barres personnalisés) :
- Code-barres Snap-In 2 : 1G (pour le tube réactionnel SARS-CoV-2 [N1 + N2] reaction tube).
 - Code-barres Snap-In 3 : 11 (pour le Rehydratation Buffer Tube).
 - Code-barres Snap-In 4 : autre tube réactionnel VIASURE (opercule différent) si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Section 8.3.1) (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation (section 8.3.1)).
- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 3).
- Remarque : l'utilisation de ce produit est possible en association avec un autre test VIASURE pour BD MAX™, les « PCR Settings » (Réglages PCR) et les « Test Steps » (Étapes du test) doivent être effectués pour les clips positions Snap-In 2 (vert) et Snap-In 4 (bleu).

Channel (Canal)	Alias (Pseudo)	Gain (Gain)	Threshold (Seuil)	Ct Min (Ct min.)	Ct Max (Ct max.)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Cible N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Cl endogène	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Cible N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tableau 3. PCR settings (Réglages PCR).

Remarque : Il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

- 10) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 4) suivants :

		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)				
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel (Canal d'excitation)	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	-

Tableau 4. Paramètres crosstalk spectraux (Cross-talk spectral).

- 11) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisissez le protocole PCR (tableau 5).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps)	Temperature (Température)	Detect (Détection)
Reverse transcription (Transcription inverse)	Maintien	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension (collecte de données))	2-température	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

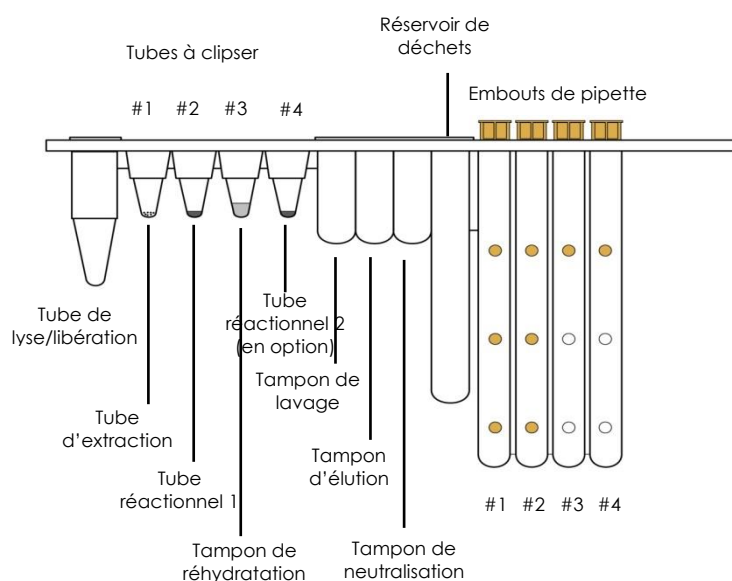
Tableau 5. Protocole PCR.

12) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).

8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- 1) Prenez une barrette unitaire de réactifs du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond du tube et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du système BD MAX™.
- 2) Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- 3) Déterminez et séparez le nombre approprié de SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (opercule 1G) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir – voir figure 1).
 - a. Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - b. Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
 - i. Remarque : si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation) (Section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels VIASURE supplémentaires (opercule différent) et clipsez-les dans les positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer tubes (opercule 11) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
 - a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le tampon se trouve entièrement au fond du tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA barrette réactive (TNA) du kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du système BD MAX™ (logiciel v4.50A ou supérieur).
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification du tube de tampon d'échantillon dans la fenêtre Tube d'échantillon de la « Work list » (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la « Work list » (Liste de travail) et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les tubes de tampon d'échantillon soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les tubes de tampon d'échantillon sont correctement appariés.
- 6) Placez le tube de tampon d'échantillon préparé dans le(s) portoir(s) du système BD MAX™.
- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le système BD MAX™ (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de PCR BD MAX™ Cartridge(s) dans le système BD MAX™.
- 9) Fermez la porte du système BD MAX™.
- 10) Cliquez sur « Start Run » (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.4. Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquez sur la touche « Results » (Résultats).
- 2) Faites un double-clic sur votre programme dans la liste ou appuyez sur la touche « View » (Aperçu).
- 3) Cliquez sur « Print » (Imprimer), sélectionnez : « Run Details, Test Details and Plot... » (Détails du programme, détails du test et trame...).
- 4) Cliquez sur la touche « Print or Export » (Imprimer ou Exporter) sur l'écran « Run Reports » (Produire des rapports).

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser les données, veuillez consulter le mode d'emploi du système BD MAX™.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAX™ selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs Ct et les courbes d'amplification pour chaque canal détecteur de chaque échantillon testé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 3). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 6.

Vérifiez le signal du contrôle interne pour vous assurer du fonctionnement correct du mélange d'amplification. Vérifiez en outre qu'il n'y a pas de rapport de défaillance du système BD MAX™.

Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :

SARS-CoV-2 (cible N2) (475/520)	Contrôle interne endogène (530/565)	SARS-CoV-2 (cible N1) (630/665)	Interprétation
+	+/- ¹	+	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté¹
+2	+/- ¹	-	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté^{1,2}
-	+/- ¹	+2	ARN du gène N du SARS-CoV-2 détecté^{1,2}
-	+ ³	-	ARN du gène N du SARS-CoV-2 non détecté³
-	_ ³	-	Résultat non résolu (UNR, Unresolve result) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu avec le traitement de l'échantillon et/ou les étapes d'amplification.³
IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) en raison d'une défaillance du système BD MAX™. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète

Tableau 6. Interprétation de l'échantillon.

+ : l'amplification a eu lieu

- : l'amplification n'a pas eu lieu

1 Un échantillon est jugé positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne (CI) endogène peut afficher ou non un signal d'amplification. Parfois, la détection par CI ne s'avère pas nécessaire parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible.

2 Si un seul site cible du gène *N* s'amplifie, vérifiez la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence. En cas de doute sur l'interprétation, il est également recommandé, selon le matériau disponible, de procéder comme suit :

- a) extraire une autre aliquote du même spécimen (accroître si possible le volume d'échantillon à 750 µl) et procéder à un nouveau test ou
- b) obtenir un nouveau spécimen et procéder à un nouveau test.

3 Dans le cas de sites cibles négatifs pour le SARS-CoV-2, l'IC doit afficher un signal d'amplification avec une valeur CT inférieure à 35. La valeur CT peut s'avérer très variable dès lors que le contrôle interne endogène est un gène domestique humain qui devrait être présent dans toutes les cellules nucléées humaines de l'échantillon d'origine. En l'absence de signal ou en cas de valeur $Ct \geq 35$ du contrôle interne endogène, le résultat est jugé « non résolu » et un nouveau test est exigé.

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi, le processus d'extraction mis en œuvre par l'utilisateur, de vérifier la bonne exécution de chaque étape du RT-qPCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.

Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec des écouvillons nasopharyngés et oropharyngés et des échantillons de salive, tous deux collectés en VTM.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons respiratoires.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par le SARS-CoV-2, soit par des échantillons contenant de fortes concentrations de l'ARN cible, soit à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- Les combinaisons d'amorces et de sondes spécifiques pour la détection de zones conservées du gène *N* utilisées dans le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été

conçues sur la base du test CDC États-Unis pour la détection spécifique du SARS-CoV-2 par l'amplification de deux zones uniques du gène *N*. Elles ne présentent pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine, le SARS-CoV ou d'autres coronavirus, lesquelles pourraient entraîner des faux positifs prévisibles.

- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ARN).
 - La dégradation de l'ARN viral durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variantes nouvelles ou inconnues de SARS-CoV-2.
 - Une charge virale dans l'échantillon inférieure à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes. L'impact des vaccins, des thérapies antivirales, des antibiotiques, des chimiothérapies ou des médicaments immunosuppresseurs utilisés pour prévenir la COVID-19 ou utilisés pendant le traitement de l'infection n'a pas été évalué.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Une amplification d'un site cible unique voire des résultats positifs aléatoires suggèrent un rendement d'amplification légèrement différent des sites cibles du gène *N*. Les échantillons présentant une faible charge virale peuvent entraîner une amplification de cible unique de *N*. En cas de doute, il est recommandé de se référer à un laboratoire de référence pour des tests supplémentaires, si cliniquement indiqué.
- Il est possible que certains échantillons ne présentent pas de courbes d'amplification du *RNase P* en raison du faible nombre de cellules humaines dans l'échantillon clinique d'origine. Un signal CI négatif n'exclut pas la présence de l'ARN du SARS-CoV-2 dans un échantillon clinique.
- Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de virus viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences virales cibles (gènes *N*).
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient. Les types d'échantillons et le moment optimaux pour les pics de concentration virale pendant les infections causées par le SARS-CoV-2 n'ont pas été déterminés. Le prélèvement de plusieurs échantillons (types et moments) sur un même patient peut s'avérer nécessaire pour détecter le virus.
- Si les tests de diagnostic d'autres maladies respiratoires sont négatifs et que la présentation clinique du patient et les informations épidémiologiques suggèrent que l'infection par le SARS-CoV-2 est possible, il convient alors d'envisager un résultat faux négatif et de discuter d'un nouveau test pour le patient.
- En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne (CI) endogène qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques de performance

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testée à l'aide d'écouvillons nasopharyngés et oropharyngés prélevés sur des patients présentant une suspicion d'infection respiratoire. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	écouvillon nasopharyngé	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	écouvillon nasopharyngé	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit en utilisant le KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tableau 7. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Valeurs positives et négatives vraies, valeurs positives et négatives fausses, valeurs de sensibilité et de spécificité pour VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été calculés par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans les tableaux suivants :

Site	Test comparateur	Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
1	Simplexa™ COVID-19 Direct assay	SARS-CoV-2	63	189	2	0	100% (94-100)	99% (96-99)
	Cobas® SARS-CoV-2 real time RT-PCR test	SARS-CoV-2	16	58	2	0	100% (79-100)	96% (88-99)
	Allplex™2019-nCoV Assay	SARS-CoV-2	71	75	0	0	100% (94-100)	100% (95-100)
2	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	SARS-CoV-2	99	0	0	0	100% (96-100)	n.a*

Tableau 8. Valeurs positives et négatives vraies, valeurs positives et négatives fausses, valeurs de sensibilité et de spécificité, valeurs PPV et NPV pour VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Les échantillons négatifs n'ayant pas été analysés, le calcul de la spécificité du test n'a pu être effectué.

Afin d'évaluer la compatibilité de différentes matrices d'échantillons (écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé et écouvillon nasopharyngé/oropharyngé dans le VTM de Vircell), une étude de compatibilité a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que les trois matrices d'échantillons différentes étaient compatibles avec le SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Les caractéristiques de VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sur des échantillons de salive ont été évaluées. Des échantillons uniques de salive négative enrichis avec une concentration connue de culture 2019 Novel Coronavirus, souche:2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK), congelée, quantifiée et inactivée par la chaleur, ont été testés. L'évaluation a été conçue pour être réalisée avec 30 échantillons positifs (20 échantillons 2 fois LoD (2xLoD), équivalent à 0,53 copies de génome (GC)/ μ L, et 10 échantillons 5 fois LoD (5xLoD) équivalent à 1,32 copies de génome (GC)/ μ L) et 10 échantillons négatifs. Ce test a été réalisé à l'aide d'un volume d'échantillon de 750 μ L de chacune des conditions ajouté au Sample Buffer Tube (SBT) du TNA-3 Extraction Kit et il a été mené en mode de processus complet (extraction et amplification PCR automatisées) en utilisant le BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Le pourcentage de concordance a été calculé par rapport au résultat anticipé pour chaque échantillon particulier et les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon de salive	Concordance
Échantillon positif (2xLoD)	97.5%
Échantillon positif (5xLoD)	100%
Échantillon négatif	100%

Tableau 9. Les caractéristiques de VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sur des échantillons de salive ont été évaluées.

En conclusion, les échantillons de salive étaient compatibles avec le kit de détection VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Les résultats montrent une concordance élevée pour la détection du SARS-CoV-2 avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection ≥ 5 copies génomiques par réaction sur les écouvillons nasopharyngés et ≥ 10 copies génomiques par réaction sur les échantillons de salive avec un taux positif ≥ 95 %.

Remarque : La limite de détection sur les échantillons de salive a été calculée en utilisant un volume d'échantillon de 750 μ L (dilution 1:3 dans le VTM).

Figure 2. Dilution en série du SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 et 5.0×10^0 copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

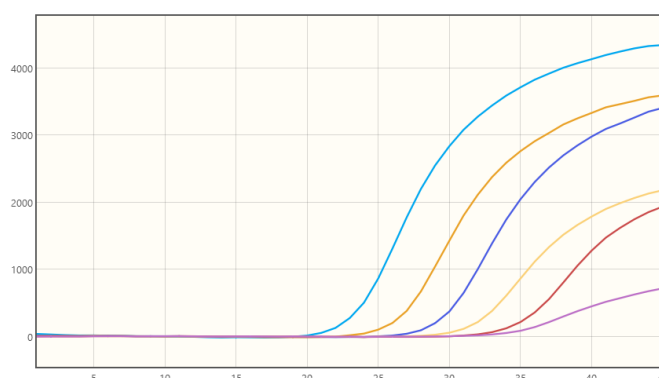
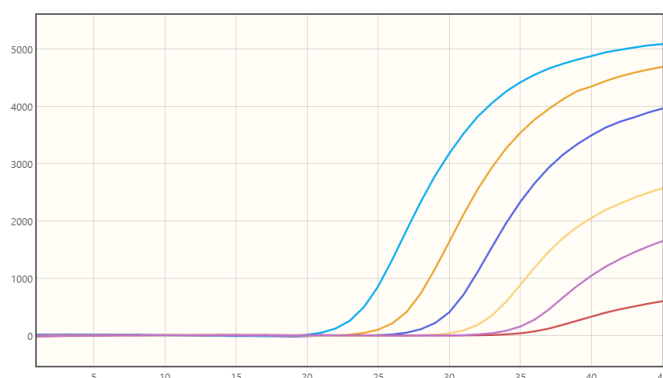


Figure 3. Dilution en série du SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 et 5.0×10^0 copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 630/665 [Cy5]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test SARS-CoV-2 (N1 + N2) a été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les agents pathogènes des voies respiratoires les plus courants. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants :

Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Virus influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Humain Bocavirus	-	Virus influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Métapneumovirus humain A et B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> non résistant à la rifampine	-
Génotype <i>Chlamydia psittaci</i> A et C	-	Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> type A1 et g885652	-
Coronavirus humain 229E, OC43, NL63 et HKU1	-	Virus influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Rhinovirus humain type C	-
Coronavirus MERS	-	Virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Coronavirus SARS souche Francfort 1	-	Virus influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Entérovirus 68 et 71	-	Virus influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Entérovirus échovirus 11 et 30	-	Virus influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Entérovirus coxsackievirus A24, A9 et B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus respiratoire syncytial (RSV) A et B	-

Tableau 10. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

12.4. Réactivité analytique











La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été évaluée par rapport à l'ARN d'une souche de 2019-nCoV humaine BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, d'une souche de 2019-nCoV humaine 2019-nCoV/Italy-INMI1, d'une souche de SARS-CoV-2 2019nCoV/USA-WA1/2020, d'une souche de SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, d'une souche de SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, d'une souche de SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER et des contrôles par ARN synthétique pour quatre variantes du virus SARS-CoV-2 : SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, B.1.1.7_710528 et B.1.1.7_601443 montrant un résultat positif.

Bibliography/ Bibliographie

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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.
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 January 2021.

Symbols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic in vitro		Keep dry Conserver dans un endroit sec		Use by Utiliser avant		Manufacturer Fabricant	 LOT	Batch code Numéro de lot
	Consult instructions for use Consulter les consignes d'utilisation		Temperature limitation Limitation de température		Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)		DIL Sample diluent Diluant d'échantillon	 REF	Catalogue number Numéro de catalogue

Trademarks

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

Change Control / Contrôle des modifications		
Version No. / Version n°	Changes / Modifications	Date / Date
00	Original version/ Version originale.	19/05/2021

Table A 2. Control change table / Tableau de contrôle des modifications.

Revision: 19th May 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01