

**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 / Αυτές οι οδηγίες χρήσης ισχύουν για την ακόλουθη αναφορά:

<b>PRODUCT / ΠΡΟΪΟΝ</b>	<b>REFERENCE / ΑΝΑΦΟΡΑ</b>
VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444215 / VS-NC0324

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Αναφορά για το προϊόν που θα χρησιμοποιηθεί με το Σύστημα 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

## Περιεχόμενο

1.	Προβλεπόμενη χρήση .....	19
2.	Σύνοψη και επεξήγηση .....	19
3.	Αρχή της διαδικασίας.....	20
4.	Παρεχόμενα αντιδραστήρια .....	21
5.	Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που παρέχονται από τον χρήστη.....	21
6.	Συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης .....	21
7.	Προφυλάξεις για τους χρήστες .....	21
8.	Διαδικασία δοκιμής.....	23
8.1.	Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων.....	23
8.2.	Προετοιμασία δειγματοσ και εξαγωγή RNA.....	23

---

8.3.	Πρωτοκολλο PCR .....	24
9.	Ερμηνεία αποτελεσμάτων .....	28
10.	Περιορισμοί του τεστ .....	30
11.	Ποιοτικός έλεγχος .....	31
12.	Χαρακτηριστικά απόδοσης .....	31
12.1.	Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα .....	31
12.2.	Ευαισθησία ανάλυσης .....	33
12.3.	Αναλυτική ειδικότητα.....	34
12.4.	Αναλυτική αντιδραστικότητα .....	35
	Bibliography/ Βιβλιογραφία .....	36
	Symbols for IVD components and reagents/ Σύμβολα για στοιχεία και αντιδραστήρια IVD.....	37
	Trademarks.....	37

---

## 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) (Viracell 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™ ExK™ 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™ ExK™ 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™ ExK™ 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	✓

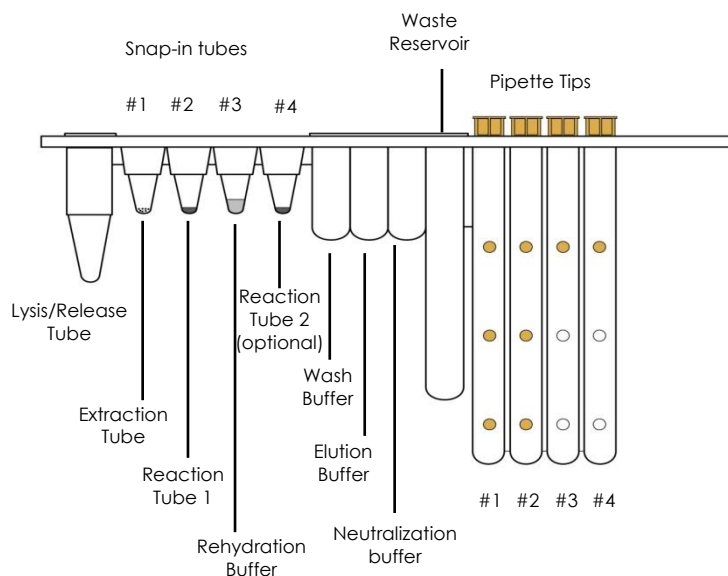
Table 5. PCR protocol.

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
+	+/- <sup>1</sup>	+	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected</b> <sup>1</sup>
+ <sup>2</sup>	+/- <sup>1</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected</b> <sup>1,2</sup>
-	+/- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected</b> <sup>1,2</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected</b> <sup>3</sup>
-	- <sup>3</sup>	-	<b>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.</b> <sup>3</sup>
IND	IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

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  $\geq 35$  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  $\geq 5$  genome copies per reaction on nasopharyngeal swabs and  $\geq 10$  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  $\mu\text{L}$  (dilution 1:3 in VTM).

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

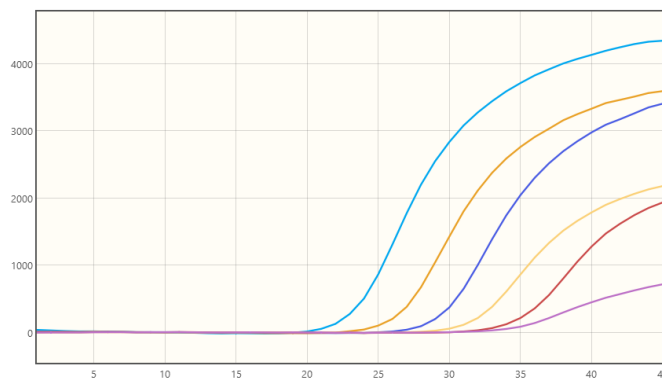
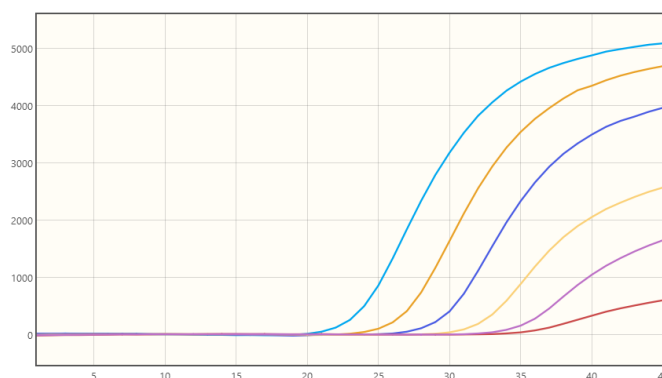


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9.9 \times 10^4$ - $9.9 \times 10^0$  and  $5.0 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 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 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.

## ΕΛΛΗΝΙΚΑ

### 1. Προβλεπόμενη χρήση

Το VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System είναι ένα αυτοματοποιημένο τεστ RT-PCR πραγματικού χρόνου, το οποίο έχει σχεδιαστεί για την ποιοτική ανίχνευση του RNA του SARS-CoV-2 σε δείγματα ρινοφαρυγγικού/στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος και σιέλου από άτομα που θεωρούνται ύποπτα κρούσματα της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19) από τον επαγγελματία υγείας τους. Αυτό το τεστ προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση της COVID-19 σε συνδυασμό με τους παράγοντες κλινικού και επιδημιολογικού κινδύνου. Η ανάλυση χρησιμοποιεί το σύστημα BD MAX™ System για την αυτοματοποιημένη εξαγωγή του RNA και της επακόλουθης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), αξιοποιώντας τα αντιδραστήρια που παρέχονται σε συνδυασμό με καθολικά αντιδραστήρια και αναλώσιμα για το σύστημα BD MAX™ System. Το RNA εξαγάγεται από κλινικά δείγματα, και το συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντίθεται και ενισχύεται χρησιμοποιώντας RT-PCR και ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας φθορίζοντες ανιχνευτές χρωστικής αναφοράς, ειδικούς για τον SARS-CoV-2.

### 2. Σύνοψη και επεξήγηση

Οι κορωνοϊοί είναι ιοί μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας με περίβλημα και ανήκουν στην οικογένεια Coronaviridae [1,2]. Υπάρχουν έξι είδη κορωνοϊών που είναι γνωστό ότι προκαλούν ανθρώπινα νοσήματα [2]. Τέσσερις ιοί (229E, OC43, NL63 και HKU1) προκαλούν συμπτώματα όμοια με της κοινής γρίπης και οι άλλοι δύο (κορωνοϊός σοβαρού οξέως αναπνευστικού συνδρόμου (SARS-CoV) και κορωνοϊός αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (MERS-CoV)) είναι ζωονοσογόνοι και προκαλούν σοβαρότερες επιπλοκές [2]. Οι SARS-CoV και MERS-CoV έχουν προκαλέσει περισσότερα από 10.000 αθροιστικά περιστατικά τις δύο προηγούμενες δεκαετίες, με ποσοστό θνησιμότητας 34% για τον MERS-CoV και 10% για τον SARS-CoV [1,3].

Τον Δεκέμβριο του 2019, μερικοί άνθρωποι που δούλευαν ή ζούσαν γύρω από την αγορά θαλασσιών Χουανάν στη Γουχάν της επαρχίας Χουμπέι στην Κίνα, παρουσίασαν πνευμονία άγνωστης αιτίας [2,4]. Η ανάλυση βαθιάς αλληλούχισης των αναπνευστικών δειγμάτων υποδείκνυε έναν νέο κορωνοϊό, ο οποίος αρχικά ονομάστηκε νέος κορωνοϊός 2019 (2019-nCoV) και μετέπειτα SARS-CoV-2 [5].

Η μετάδοση μεταξύ ανθρώπων του SARS-CoV-2 έχει επιβεβαιωθεί, ακόμη και κατά την περίοδο επώασης χωρίς συμπτώματα, και ο ιός προκαλεί σοβαρά αναπνευστικά νοσήματα όπως αυτά που προκαλούσε ο SARS-CoV [1,6,7,8]. Παρόλο που η πνευμονία είναι το κύριο συσχετιζόμενο νόσημα, ορισμένοι ασθενείς έχουν υποστεί σοβαρή πνευμονία, πνευμονικό οίδημα, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας ή πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων και θάνατο [1,4]. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) θεωρούν ότι τα συμπτώματα του SARS-CoV-2 μπορεί να παρουσιαστούν σε μόλις 2 ημέρες ή εντός έως και 14 ημερών μετά την έκθεση και τα πιο κοινά από αυτά περιλαμβάνουν πυρετό ή ρίγη, βήχα, κόπωση, ανορεξία, μυαλγία και δύσπνοια [1,4,6,9]. Λιγότερο κοινά είναι συμπτώματα είναι ο πονόλαιμος, η ρινική συμφόρηση, ο πονοκέφαλος, η διάρροια, η ναυτία και ο έμετος [1,4]. Έχει επίσης αναφερθεί απώλεια όσφρησης (ανοσμία) ή απώλεια γεύσης (αγευσία) πριν από την εκδήλωση αναπνευστικών συμπτωμάτων [9]. Οι ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας και τα άτομα με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα, όπως η καρδιακή ή πνευμονική νόσος ή ο διαβήτης, φαίνεται να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης πιο σοβαρών επιπλοκών από την ασθένεια COVID-19 [10].

Η διάγνωση της COVID-19 εκτελείται με τον εντοπισμό των συνήθων αιτιών της πνευμονίας νωρίς και ανιχνεύεται από τις μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας επόμενης γενιάς ή RT-PCR σε πραγματικό χρόνο [1,11]. Προσφάτως έχουν καταστεί διαθέσιμες αρκετές αναλύσεις που ανιχνεύουν τον SARS-CoV-2, όπως αυτές των CDC Κίνας (γονίδια-στόχοι *ORF1ab* και *N*), Charité – Γερμανία (γονίδια-στόχοι *RdRP* και *E*) ή CDC ΗΠΑ (δύο στόχοι στο γονίδιο *N*) [12].

Το CDC συνιστά τη χρήση δειγμάτων της ανώτερης αναπνευστικής οδού (ρινοφαρυγγικά (NP) και στοματοφαρυγγικά (OP) επιχρίσματα, επιχρίσμα μέσης ρινικής κόγχης, ρινικό επίχρισμα, ρινοφαρυγγικό έκπλυμα/αναρρόφημα ή ρινικό έκπλυμα/αναρρόφημα (NW) και δείγματα σάλιου, τα οποία συλλέγονται κυρίως από επαγγελματίες υγείας) ή/και δείγματα της κατώτερης αναπνευστικής οδού (πτύελο, ενδοτραχειακή αναρρόφηση ή βρογχοκυελιδικό έκπλυμα σε ασθενείς με πιο σοβαρή αναπνευστική νόσο) για την ταυτοποίηση του SARS-CoV-2 [11]. Επιπλέον, άλλα κλινικά δείγματα όπως αίμα, ούρα και κόπρανα, μπορεί να συλλεχθούν για την εποπτεία την παρουσίας του ιού [11,12].

### 3. Αρχή της διαδικασίας

Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System έχει σχεδιαστεί για την ποιοτική ανίχνευση του RNA του SARS-CoV-2 σε δείγματα ρινοφαρυγγικού/στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος και σιέλου. Η ανίχνευση γίνεται με μέθοδο RT-PCR ενός βήματος σε πραγματικό χρόνο, όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η επακόλουθη ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου συμβαίνουν στο ίδιο σωληνάριο αντίδρασης. Ο απομονωμένος στόχος RNA μεταγράφεται, δημιουργώντας συμπληρωματικό DNA με αντίστροφη μεταγραφάση που ακολουθείται από την ενίσχυση δύο διατηρημένων περιοχών του γονιδίου *N* (*N1* και *N2*) χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους εκκινητές και ανιχνευτές φθορίζουσας σήμανσης.

Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System βασίζεται στη δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 5' της πολυμεράσης DNA. Κατά την ενίσχυση του DNA, αυτό το ένζυμο διασπά τον ανιχνευτή που συνδέεται με τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA, διαχωρίζοντας τη χρωστική απόσβεσης από τον ανιχνευτή αναφοράς. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί αύξηση στο σήμα φθορισμού που είναι ανάλογη με την ποσότητα του προτύπου-στόχου. Η μέτρηση του φθορισμού αυτού γίνεται στο σύστημα BD MAX™.

Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System περιέχει σε κάθε σωλήνα όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο (ειδικοί εκκινητές/ανιχνευτές, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα, πολυμεράση, αντίστροφη μεταγραφάση) σε σταθεροποιημένη μορφή, καθώς και έναν ενδογενή εσωτερικό μάρτυρα για την παρακολούθηση της διαδικασίας εξαγωγής ή/και της αναστολής της δραστηριότητας της πολυμεράσης. Η ανάλυση χρησιμοποιεί ένα ανθρώπινο διαχειριστικό γονίδιο ως ενδογενή εσωτερικό μάρτυρα (IC) (ανθρώπινο γονίδιο *RNase P*). Τα ανθρώπινα διαχειριστικά γονίδια εμπλέκονται στη βασική συντήρηση των κυττάρων και, συνεπώς, αναμένεται να υπάρχουν σε όλα τα εμπύρνηνα ανθρώπινα κύτταρα και να διατηρούν σχετικά σταθερά επίπεδα έκφρασης.

Στόχος	Κανάλι	Γονίδιο
SARS-CoV-2	475/520	γονίδιο <i>N</i> (Περιοχή <i>N2</i> )
SARS-CoV-2	630/665	γονίδιο <i>N</i> (Περιοχή <i>N1</i> )
Ενδογενή Εσωτερικό Μάρτυρα (CI)	530/565	ανθρώπινο γονίδιο <i>RNase P</i>

Πίνακας 1. Στόχος, κανάλι και γονίδια.

## 4. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System περιλαμβάνει τα ακόλουθα υλικά και αντιδραστήρια που παρατίθενται αναλυτικά στον Πίνακα 2:

Αντιδραστήριο/Υλικό	Περιγραφή	Γραμμωτός κώδικας	Ποσότητα
SARS-CoV-2 (N1 +N2) reaction tube	Ένα μείγμα ενζύμων, ανιχνευτών-εκκινητών, ρυθμιστικού διαλύματος, dNTPs, σταθεροποιητών και ενδογενούς εσωτερικού μάρτυρα σε σταθεροποιημένη μορφή	1G αλουμινόχαρτο	2 σακούλες των 12 διάφανο σωληναρίων
Rehydration Buffer tube	Διάλυμα για την ανασύσταση του σταθεροποιημένου προϊόντος	11 αλουμινόχαρτο	1 σακούλα των 24 διάφανο σωληναρίων

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια και υλικά που παρέχονται με το VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System με Αρ. Κατ. VS-NCO324 (444215).

## 5. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που παρέχονται από τον χρήστη

Στην ακόλουθη λίστα περιλαμβάνονται τα υλικά και ο εξοπλισμός που απαιτούνται για τη χρήση αλλά δεν περιλαμβάνονται στο κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο: BD MAX™ System.
- BD MAX™ Εκ™ TNA-3 (Αναφ.:442827 ή 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Αναφ.: 437519).
- Στρόβιλος.
- Μικροπιπέτες (ακρίβεια μεταξύ 2 και 1000 µL).
- Άκρα φίλτρου.
- Γάντια μίας χρήσης χωρίς πούδρα.

## 6. Συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης

- Τα κιτ μπορούν να αποσταλούν και να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες 2-40°C έως την ημερομηνία λήξης η οποία δηλώνεται στην ετικέτα.
- Μετά το άνοιγμα των θηκών αλουμινίου που περιέχουν τους σωλήνες αντίδρασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έως και 28 ημέρες.

## 7. Προφυλάξεις για τους χρήστες

- Το προϊόν προορίζεται για χρήση μόνο από επαγγελματίες, όπως επαγγελματίες και τεχνικούς εργαστηρίου ή νοσηλευτικού ιδρύματος οι οποίοι έχουν εκπαιδευτεί σε μοριακές βιολογικές τεχνικές.
- Για διαγνωστικούς σκοπούς in vitro.
- Μην χρησιμοποιείτε ληγμένα αντιδραστήρια ή/και υλικά.
- Μην χρησιμοποιείτε το κιτ εάν έχει ανοιχτεί η ετικέτα που σφραγίζει το εξωτερικό κουτί.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν το προστατευτικό κουτί είναι ανοιχτό ή σπασμένο κατά την άφιξη.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν οι προστατευτικές θήκες είναι ανοιχτές ή σπασμένες κατά την άφιξη.

- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν δεν υπάρχει το αποξηραντικό ή αν είναι σπασμένο μέσα στις θήκες των αντιδραστηρίων.
- Μην αφαιρείτε το αποξηραντικό από τις θήκες αντιδραστηρίων.
- Κλείστε αμέσως τα προστατευτικά σακουλάκια των αντιδραστηρίων με το φερμουάρ σφράγισης μετά από κάθε χρήση. Αφαιρέστε τυχόν πλεονάζοντα αέρα από τα σακουλάκια πριν από τη σφράγιση.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια εάν το αλουμινοχαρτό έχει ανοιχτεί ή έχει υποστεί ζημιά.
- Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά σακουλάκια ή/και κιτ ή/και παρτίδες.
- Προστατεύστε τα αντιδραστήρια από την υγρασία. Η παρατεταμένη έκθεση σε υγρασία μπορεί να επηρεάσει την απόδοση του προϊόντος.
- Διατηρήστε τα στοιχεία μακριά από το φως.
- Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες διεξάγονται άλλα τεστ PCR στην ίδια γενική περιοχή του εργαστηρίου, πρέπει να είστε ιδιαίτερα προσεκτικοί ώστε να εξασφαλίσετε ότι το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, το κιτ εξαγωγής BD MAX™ ExK™ TNA-3, τυχόν πρόσθετα αντιδραστήρια που απαιτούνται για τον έλεγχο και το σύστημα BD MAX™ δεν έχουν μολυνθεί. Αποφύγετε πάση θυσία τη μόλυνση των αντιδραστηρίων από μικρόβια και ριβονουκλεάση (RNase)/δεοξυριβονουκλεάση (DNase). Συνιστάται η χρήση στείρων άκρων πιπέτας μίας χρήσης χωρίς ριβονουκλεάση (RNase)/δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ανθεκτικών σε αεροζόλ ή θετικής μετατόπισης. Χρησιμοποιήστε νέο άκρο για κάθε δείγμα. Θα πρέπει να αλλάζετε γάντια πριν από το χειρισμό των αντιδραστηρίων και των δοχείων (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Για την αποφυγή μόλυνσης του περιβάλλοντος από αμπλικόνια, μην αποσυναρμολογήσετε το δοχείο BD MAX™ PCR Cartridge μετά τη χρήση. Οι δακτύλιοι στεγανοποίησης του δοχείου BD MAX™ PCR Cartridge έχουν σχεδιαστεί για την αποφυγή της μόλυνσης.
- Σχεδιάστε μια μονόδρομη ροή εργασιών. Θα πρέπει να ξεκινά από την περιοχή εξαγωγής και να συνεχίζει στην περιοχή ενίσχυσης και ανίχνευσης. Μην επιστρέφετε δείγματα, εξοπλισμό και αντιδραστήρια στην περιοχή στην οποία πραγματοποιήθηκε το προηγούμενο βήμα.
- Ακολουθήστε τις καλές πρακτικές εργαστηρίου. Φορέστε προστατευτικά ρούχα, χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, γυαλιά και μάσκα. Μην τρώτε, πίνετε καπνίζετε ή εφαρμόστε καλλυντικά προϊόντα στην περιοχή εργασίας. Πλύνετε τα χέρια σας μετά την ολοκλήρωση του τεστ.
- Τα δείγματα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά και / ή βιολογικά επικίνδυνος, όπως επίσης και όλα τα αντιδραστήρια και τα υλικά που έχουν εκτεθεί στα δείγματα και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς ασφαλείας. Λάβετε τις απαραίτητες προφυλάξεις κατά τη συλλογή, μεταφορά, την αποθήκευση, το χειρισμό και την απόρριψη των δειγμάτων.
- Ο χειρισμός των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας. Χρησιμοποιείτε personal protective equipment (PPE) που συνάδει με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, για τον χειρισμό των δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων. Η διάθεση των αποβλήτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους ισχύοντες τοπικούς και περιφερειακούς κανονισμούς.
- Συνιστάται η τακτική απολύμανση του συνήθως χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού, ειδικά στις μικροπιπέτες και τις επιφάνειες εργασίας.
- Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1907/2006 (REACH), δεν απαιτούνται δελτία δεδομένων ασφαλείας (Safety Data Sheets) για τα κιτ "VIASURE Real Time PCR Detection Kits", λόγω της ταξινόμησής τους ως μη επικίνδυνων για την υγεία και το περιβάλλον, εφόσον δεν περιέχουν ουσίες ή/και μείγματα που να ανταποκρίνονται στα κριτήρια ταξινόμησης ουσιών ως επικίνδυνων, όπως αυτά παρουσιάζονται στον

Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1272/2008 (CLP), ή οι ουσίες/τα μείγματα δεν περιέχονται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την τιμή που καθορίζεται στον προαναφερθέντα κανονισμό για τη δήλωσή τους.

- Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™ για πρόσθετες προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και διαδικασίες.

## 8. Διαδικασία δοκιμής

### 8.1. Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων

Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System έχει ελεγχθεί σε ρινοφαρυγγικά/στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα, τα οποία ελήφθησαν σε viral transport media (VTM) (Viracell S.L., Ισπανία). Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα συλλέχθηκαν σε μέσα BD™ UVT System, μέσω μεταφοράς και διατήρησης ιογενούς υλικού (Biosocomma®), μέσω μεταφοράς ιογενούς υλικού UTM (COPAN, Diagnostic Inc.), στείρο μέσω μεταφοράς (Deltalab®), καθολικό μέσο μεταφοράς (UTM) και μέσω IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) από την Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd. Τα δείγματα σιέλου συλλέχθηκαν σε μέσο Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ή IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Οι διαφορετικοί τύποι δειγμάτων θα πρέπει να επικυρωθούν από τον χρήστη.

Τα δείγματα συλλογής, αποθήκευσης και μεταφοράς πρέπει να διατηρούνται σύμφωνα με τις συνθήκες που επικυρώνονται από τον χρήστη. Συνολικά, τα αναπνευστικά δείγματα και σιέλου πρέπει να συλλέγονται και να επισημαίνονται κατάλληλα σε καθαρά δοχεία με ή χωρίς μέσα μεταφοράς (ανάλογα με τον τύπο του δείγματος) και να υποβάλλονται σε επεξεργασία το συντομότερο δυνατό ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα του τεστ. Τα δείγματα πρέπει να μεταφέρονται σε θερμοκρασίες από 2 έως 8°C για έως και 72 ώρες, σύμφωνα με τους τοπικούς και εθνικούς κανονισμούς για τη μεταφορά παθογόνου υλικού. Για μακροπρόθεσμη μεταφορά (περισσότερες από 72 ώρες), προτείνουμε την αποστολή σε θερμοκρασία ≤-20°C ή χαμηλότερη. Προτείνεται η χρήση νέων δειγμάτων για το τεστ. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες από 2 έως 8°C για έως και 72 ώρες ή κατεψυγμένα στους -20°C ή ιδανικά στους -70°C για διατήρηση. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης πρέπει να αποφεύγονται προκειμένου να αποφευχθεί η υποβάθμιση του δείγματος και των νουκλεϊκών οξέων.

Τα δείγματα ρινοφαρυγγικού/στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος και σιέλου πρέπει να συλλέγονται, να μεταφέρονται και να φυλάσσονται σύμφωνα με τις κατάλληλες κατευθυντήριες οδηγίες του εργαστηρίου. Για λεπτομέρειες ανατρέξτε στην οδηγία CDC (Specimen collection guidelines. Ιστοσελίδα <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> και Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Ιστοσελίδα <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) και 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. Προετοιμασία δείγματος και εξαγωγή RNA

Εκτελέστε την προετοιμασία του δείγματος σύμφωνα με τις συστάσεις στις οδηγίες χρήσης του κιτ εξαγωγής που χρησιμοποιείται, BD MAX™ ExC™ TNA-3. Σημειώστε ότι ορισμένα άλλα δείγματα μπορεί να απαιτούν



προεπεξεργασία. Πρέπει να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν από τον χρήστη οι διαδικασίες προετοιμασίας εξαγωγής για συγκεκριμένες εφαρμογές.

Κατά τη χρήση ρινοφαρυγγικού ή στοματοφαρυγγικού δειγμάτων:

1. Χορηγήστε με πιπέττα από 400 έως 750 µL ρινοφαρυγγικού/στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος που συλλέχθηκε σε μέσο μεταφοράς ιογενούς υλικού (VTM) ή σε BD™ Universal Viral Transport (UVT), σε σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube, και κλείστε τον σωλήνα με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Προχωρήστε στη διαδικασία BD MAX™ System Operation.

Στην περίπτωση χρήσης δειγμάτων σιέλου που συλλέχθηκαν σε μέσο μεταφοράς:

1. Η συλλογή των δειγμάτων σιέλου μπορεί να γίνει σε μέσο μεταφοράς ιογενούς υλικού (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ή IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) σε αναλογία 1:3 (σίελος:μέσο). Αναδεύστε για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα. Χορηγήστε με πιπέττα 750 µL σε BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube και κλείστε το σωληνάριο με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Προχωρήστε στη διαδικασία BD MAX™ System Operation.

Στην περίπτωση χρήσης σκέτων δειγμάτων σιέλου:

1. Συνδυάστε τον σίελο με μέσο μεταφοράς ιογενούς υλικού (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ή IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) έτσι ώστε η τελική αναλογία σιέλου:μέσου να είναι 1:3. Αναδεύστε για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα. Κατόπιν, χορηγήστε με πιπέττα 750 µL σε BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube και κλείστε το σωληνάριο με πώμα διαφράγματος. Εξασφαλίστε την πλήρη ανάμιξη στροβιλίζοντας το δείγμα σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Προχωρήστε στη διαδικασία BD MAX™ System Operation.

### 8.3. Πρωτοκολλο PCR

Σημείωση: Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™ για αναλυτικές οδηγίες.

#### 8.3.1. Δημιουργία προγράμματος τεστ PCR για το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Σημείωση: Αν έχετε ήδη δημιουργήσει το τεστ για το VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, μπορείτε να παραλείψετε το βήμα 8.3.1 και να μεταβείτε απευθείας στο βήμα 8.3.2.

- 1) Στην οθόνη "Run" (Εκτέλεση) του συστήματος BD MAX™, επιλέξτε την καρτέλα "Test Editor" (Επεξεργασία τεστ).
- 2) Κάντε κλικ στο κουμπί "Create" (Δημιουργία).
- 3) Στην καρτέλα "Basic Information" (Βασικές πληροφορίες), εντός του παραθύρου "Test Name" (Όνομα τεστ), δώστε ένα όνομα στο τεστ: δηλ. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).



- 4) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Extraction Type" (Τύπος εξαγωγής), επιλέξτε "ExK TNA-3".
- 5) Στο αναπτυσσόμενο μενού "Master Mix Format" (Μορφή κύριας ανάμειξης), επιλέξτε "Type 5" (Τύπος 5).
- α. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ VIASURE για BD MAX™ και στη συνέχεια να επιλέξετε "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)).
- 6) Στην περιοχή "Sample extraction parameters" (Παράμετροι εξαγωγής δείγματος), επιλέξτε "User defined" (Καθορισμός από τον χρήστη) και προσαρμόστε τον όγκο του δείγματος σε 950 µL.
- 7) Στην περιοχή "Ct Calculation" (Υπολογισμός Ct), επιλέξτε "Call Ct at Threshold Crossing" (Κλήση Ct κατά την υπέρβαση κατωφλίου).
- 8) Εάν χρησιμοποιείτε την έκδοση λογισμικού 5.00 ή μεταγενέστερη, επιλέξτε τα ακόλουθα στο "Custom Barcodes" (Προσαρμοσμένοι γραμμωτοί κώδικες):
- α. Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 2: 1G (αφορά το σωληνάριο αντίδρασης SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
- β. Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 3: 11 (αφορά το σωληνάριο Rehydration Buffer tube).
- γ. Γραμμωτός κώδικας θέσης προσάρτησης 4: ένα άλλο σωληνάριο αντίδρασης VIASURE (διαφορετικό αλουμινόχαρτο) αν επιλέξετε τη μορφή "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5)) (Ενότητα 8.3.1).
- 9) Στην καρτέλα "PCR settings" (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε τις ακόλουθες παραμέτρους: "Channel Settings" (Ρυθμίσεις καναλιού), "Gains" (Αυξήσεις) και "Threshold" (Κατώφλιο) (Πίνακας 3).
- α. Σημείωση: Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με πρόσθετο τεστ VIASURE για BD MAX™. Οι "PCR Settings" (ρυθμίσεις PCR) και τα "Test Steps" (βήματα του τεστ) θα πρέπει να ολοκληρωθούν για τις θέσεις προσάρτησης Snaρ-In 2 (πράσινο) και Snaρ-In 4 (μπλε).

Channel (Κανάλι)	Alias (Ψευδώνυμο)	Gain (Αύξηση)	Threshold (Κατώφλιο)	Ct Min (Ελάχιστο Ct)	Ct Max (Μέγιστο Ct)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Στόχος N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Ενδογενής IC	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Στόχος N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Πίνακας 3. PCR settings (Ρυθμίσεις PCR).

Σημείωση: Συνιστάται να ορίσετε τις ελάχιστες τιμές κατωφλίου που αναφέρονται παραπάνω για κάθε κανάλι ως σημείο εκκίνησης, αλλά οι τελικές ρυθμίσεις πρέπει να καθορίζονται από τον τελικό χρήστη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα κατώφλια εμπίπτουν εντός της εκθετικής φάσης των καμπυλών φθορισμού και πάνω από οποιοδήποτε σήμα υποβάθρου. Η τιμή κατωφλίου μπορεί να διαφέρει για διαφορετικά όργανα λόγω των διαφορετικών εντάσεων σήματος.

- 10) Στην καρτέλα "PCR settings" (Ρυθμίσεις PCR), εισαγάγετε επίσης τις ακόλουθες παραμέτρους "Spectral Cross Talk" (Φασματική συνακρόαση) (Πίνακας 4).

		<b>False Receiving Channel (Εσφαλμένο κανάλι υποδοχής)</b>					
		<b>Channel (Κανάλι)</b>	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
<b>Excitation Channel (Κανάλι διέγερσης)</b>	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	-	

Πίνακας 4. Παράμετροι φασματικής συνακρόασης ("Spectral cross-talk").

11) Στην καρτέλα "Test Steps" (Βήματα τεστ), εισαγάγετε το πρωτόκολλο PCR (Πίνακας 5).

<b>Step Name (Όνομα βήματος)</b>	<b>Profile Type (Τύπος προφίλ)</b>	<b>Cycles (Ciclos)</b>	<b>Time (s) (Tiempo (s))</b>	<b>Temperature (Temperatura)</b>	<b>Detect (Defección)</b>
Reverse transcription (Αντίστροφη μεταγραφή)	Choque térmico	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Αρχική μετουσίωση)	Choque térmico	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Μετουσίωση και ανόπτηση/επέκταση (Συλλογή δεδομένων))	2-Temperaturas	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Πίνακας 5. Πρωτόκολλο PCR.

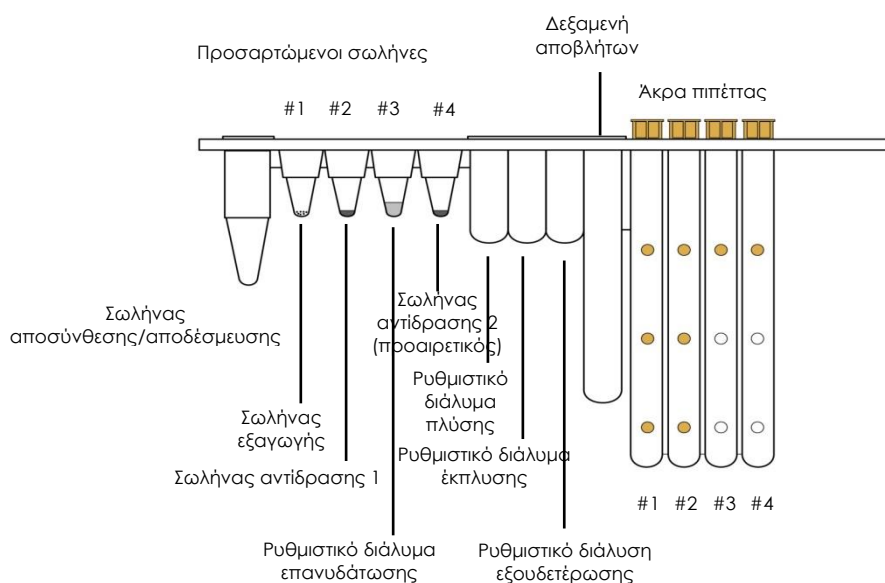
12) Κάντε κλικ στο κουμπί "Save Test" (Αποθήκευση τεστ).

### 8.3.2. Ρύθμιση ραφιών BD MAX™

- 1) Για κάθε δείγμα προς έλεγχο, αφαιρέστε μία Ενιαία λωρίδα αντιδραστήριου από το κιτ BD MAX™ ΕκΚ™ TNA-3. Χτυπήστε απαλά κάθε λωρίδα σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα υγρά βρίσκονται στο κάτω μέρος των σωλήνων και τοποθετήστε τις στα ράφια δειγμάτων του συστήματος BD MAX™.
- 2) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων εξαγωγής BD MAX™ ΕκΚ™ TNA (B4) (λευκό αλουμινόχαρτο) από το προστατευτικό σακουλάκι. Προσαρτήστε τους σωλήνες εξαγωγής (λευκό αλουμινόχαρτο) στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα TNA (Θέση προσάρτησης 1, κωδικοποίηση λευκού χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
- 3) Προσδιορίστε και διαχωρίστε τον κατάλληλο αριθμό από σωληνάρια αντίδρασης SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (1G αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε τα στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 2, κωδικοποίηση πράσινου χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1).
  - a. Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.
  - b. Για τη διεξαγωγή της σωστής επανυδάτωσης, βεβαιωθείτε ότι το λυοφιλοποιημένο προϊόν βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το προϊόν βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

- i. Σημείωση: Αν επιλέξετε τη μορφή “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Συμπυκνωμένο λυοφιλοποιημένο MM διπλής κύριας ανάμειξης με ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης (Τύπος 5))(Ενότητα 8.3.1), προσδιορίστε και διαχωρίστε τον κατάλληλο αριθμό πρόσθετων σωλήνων αντίδρασης VIASURE (διαφορετικό αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 4, κωδικοποίηση μπλε χρώματος στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε τα αλουμινένια σακουλάκια με το φερμουάρ σφράγισης.
- 4) Αφαιρέστε τον απαιτούμενο αριθμό σωλήνων Rehydration Buffer tubes (11 αλουμινόχαρτο) και προσαρτήστε στις αντίστοιχες θέσεις στη λωρίδα (Θέση προσάρτησης 3, κωδικοποίηση χωρίς χρώμα στο ράφι. Ανατρέξτε στην Εικόνα 1). Αφαιρέστε τον πλεονάζοντα αέρα και κλείστε το σακουλάκι με φερμουάρ σφράγισης.
- α. Για να εξασφαλιστεί η σωστή μεταφορά, βεβαιωθείτε ότι το υγρό βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και δεν είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το ρυθμιστικό διάλυμα βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.

Εικόνα 1. Λωρίδα αντιδραστήριου BD MAX™ TNA (TNA) από το kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Ρύθμιση οργάνων BD MAX™

- 1) Επιλέξτε την καρτέλα “Work List” (Λίστα εργασίας) στην οθόνη “Run” (Εκτέλεση) στο λογισμικό συστήματος BD MAX™ έκδ.4.50A ή μεταγενέστερης.
- 2) Στο αναπτυσσόμενο μενού “Test” (Τεστ), επιλέξτε VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (αν δεν έχει ήδη δημιουργηθεί, ανατρέξτε στην ενότητα 8.3.1).
- 3) Επιλέξτε τον κατάλληλο αριθμό παρτίδας kit (βρίσκεται στο εξωτερικό κουτί του kit εξαγωγής που χρησιμοποιείται) από το αναπτυσσόμενο μενού (προαιρετικά).

- 4) Εισαγάγετε τον αριθμό αναγνώρισης του σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος στο παράθυρο σωλήνων δείγματος της "Work List" (Λίστα εργασίας), είτε με σάρωση του γραμμωτού κώδικα με τον σαρωτή με χειροκίνητη καταχώριση.
- 5) Συμπληρώστε το παράθυρο δείγματος/ταυτότητας ασθενούς ή/και ένταξης της "Work List" (Λίστα εργασίας) και κάντε κλικ στο κουμπί "Save" (Αποθήκευση). Συνεχίστε έως ότου καταχωριστούν όλοι οι σωλήνες ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα/η ταυτότητα ασθενούς και οι σωλήνες ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος έχουν αντιστοιχιστεί με ακρίβεια.
- 6) Τοποθετήστε τον προετοιμασμένο σωλήνα ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος στο ράφι BD MAX™.
- 7) Τοποθετήστε το ράφι στο σύστημα BD MAX™ (Το ράφι A τοποθετείται στην αριστερή πλευρά του συστήματος BD MAX™ και το ράφι B στη δεξιά πλευρά).
- 8) Τοποθετήστε τον απαιτούμενο αριθμό δοχείων BD MAX™ PCR Cartridge(s) στο σύστημα BD MAX™.
- 9) Κλείστε τη θύρα του συστήματος BD MAX™.
- 10) Κάντε κλικ στην επιλογή "Start Run" (Έναρξη εκτέλεσης) για να ξεκινήσει η διαδικασία.

### 8.3.4. Έκθεση BD MAX™

- 1) Στο κύριο μενού, κάντε κλικ στο κουμπί "Results" (Αποτελέσματα).
- 2) Κάντε διπλό κλικ στην εκτέλεση στη λίστα ή πατήστε το κουμπί "View" (Προβολή).
- 3) Κάντε κλικ στην επιλογή "Print" (Εκτύπωση) και επιλέξτε: "Run Details, Test Details and Plot..." (Λεπτομέρειες εκτέλεσης, λεπτομέρειες τεστ και ακολουθία...).
- 4) Κάντε κλικ στο κουμπί "Print or Export" (Εκτύπωση ή Εξαγωγή) στην οθόνη "Run Reports" (Εκτέλεση εκθέσεων).

## 9. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Για λεπτομερή περιγραφή του τρόπου ανάλυσης δεδομένων, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήστη του συστήματος BD MAX™.

Η ανάλυση των δεδομένων γίνεται από το λογισμικό BD MAX™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το λογισμικό BD MAX™ αναφέρει τιμές Ct και καμπύλες ενίσχυσης για κάθε κανάλι ανιχνευτή κάθε δείγματος που ελέγχεται με τον ακόλουθο τρόπο:

- Η τιμή Ct 0 υποδεικνύει ότι δεν υπολογίστηκε τιμή Ct από το λογισμικό με το καθορισμένο κατώφλιο (βλ. Πίνακα 3). Η καμπύλη ενίσχυσης του δείγματος που εμφανίζει την τιμή Ct "0" πρέπει να ελεγχθεί χειροκίνητα.
- Η τιμή Ct -1 υποδεικνύει ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία ενίσχυσης.
- Οποιαδήποτε άλλη τιμή Ct πρέπει να ερμηνεύεται σε συσχέτισμό με την καμπύλη ενίσχυσης και σύμφωνα με τις οδηγίες ερμηνείας δείγματος που περιγράφονται στον Πίνακα 6.

Ελέγξτε το σήμα εσωτερικού μάρτυρα για να επαληθεύσετε τη σωστή λειτουργία του μείγματος ενίσχυσης. Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχει έκθεση της αποτυχίας του συστήματος BD MAX™.

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να διαβάζονται και να αναλύονται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο πίνακα:

SARS-CoV-2 (στόχος N2) (475/520)	Ενδογενής εσωτερικός μάρτυρας (530/565)	SARS-CoV-2 (στόχος N1) (630/665)	Ερμηνεία
+	+/- <sup>1</sup>	+	Ανιχνεύτηκε RNA γονιδίου N SARS-CoV-2 <sup>1</sup>
+ <sup>2</sup>	+/- <sup>1</sup>	-	Ανιχνεύτηκε RNA γονιδίου N SARS-CoV-2 <sup>1,2</sup>
-	+/- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	Ανιχνεύτηκε RNA γονιδίου N SARS-CoV-2 <sup>1,2</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	Δεν ανιχνεύτηκε RNA γονιδίου N SARS-CoV-2 <sup>3</sup>
-	- <sup>3</sup>	-	Μη επιλυμένο (UNR) αποτέλεσμα που λαμβάνεται παρουσία αναστολέων στην αντίδραση PCR ή όταν προκύψει γενικό πρόβλημα (το οποίο δεν αναφέρεται από κωδικό σφάλματος) με τα βήματα επεξεργασίας ή/και ενίσχυσης δείγματος <sup>3</sup>
IND	IND	IND	Ασαφές αποτέλεσμα ανάλυσης (IND). Λόγω αποτυχίας του συστήματος BD MAX™. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας οργάνου που συνδέεται με κωδικό σφάλματος.
INC	INC	INC	Ατελές αποτέλεσμα ανάλυσης (INC). Λόγω αποτυχίας του συστήματος BD MAX™. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζεται σε περίπτωση αποτυχίας πλήρους εκτέλεσης.

Πίνακας 6. Ερμηνεία δείγματος.

+: Προέκυψε ενίσχυση

-: Δεν προέκυψε ενίσχυση

**1** Ένα δείγμα θεωρείται θετικό εάν η τιμή Ct που λαμβάνεται είναι μικρότερη από 40. Ο ενδογενής εσωτερικός μάρτυρας (IC) μπορεί να εμφανίζει ή όχι ένα σήμα ενίσχυσης. Ορισμένες φορές, η ανίχνευση IC δεν είναι απαραίτητη, επειδή ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων στόχου μπορεί να προκαλέσει προτιμησιακή ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων συγκεκριμένου στόχου.

**2** Si únicamente amplifica una diana del gen N, verifique la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. En caso de una interpretación dudosa, dependiendo del material disponible, también se recomienda:

- a) επανεξαγωγή και επανεξέταση ενός άλλου κλάσματος του ίδιου δείγματος (εάν αυτό είναι εφικτό, αυξήστε τον όγκο του δείγματος σε 750 µl) ή
- b) συλλογή νέου δείγματος και επανεξέταση.

**3** Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος για τις θέσεις-στόχους του SARS-CoV-2, ο IC πρέπει να εμφανίζει σήμα ενίσχυσης με Ct μικρότερο του 35. Η τιμή Ct μπορεί να εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις επειδή ο ενδογενής εσωτερικός μάρτυρας είναι ένα ανθρώπινο διαχειριστικό γονίδιο που πρέπει να υπάρχει σε όλα τα ανθρώπινα εμπύρνα κύτταρα του αρχικού δείγματος. Εάν δεν υπάρχει σήμα ή η τιμή Ct είναι  $\geq 35$  για τον ενδογενή εσωτερικό μάρτυρα, το αποτέλεσμα θεωρείται 'Μη επιλυμένο' και απαιτείται επανεξέταση.

Σε περίπτωση συνεχών αμφίσημων αποτελεσμάτων, συνιστάται να ελέγξετε τις οδηγίες χρήσης και τη διαδικασία εξαγωγής που χρησιμοποιεί ο χρήστης, για να επιβεβαιώσετε την ορθή εκτέλεση κάθε βήματος RT-qPCR και των αντίστοιχων παραμέτρων, καθώς και να ελέγξετε το σιγμοειδές σχήμα της καμπύλης και την ένταση του φθορισμού.

Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.

## 10. Περιορισμοί του τεστ

- Τα αποτελέσματα του τεστ θα πρέπει να αξιολογούνται από έναν επαγγελματία υγείας στο πλαίσιο του ιατρικού ιστορικού, των κλινικών συμπτωμάτων και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων.
- Αν και αυτή η ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί με άλλους τύπους δειγμάτων, έχει επικυρωθεί με ρινοφαρυγγικό/στοματοφαρυγγικό επίχρισμα και σιέλου δειγμάτων που συλλέγεται σε VTM.
- Για την ορθή εκτέλεση του τεστ, το λυοφιλοποιημένο προϊόν πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και να μην είναι προσκολλημένο στην επάνω περιοχή του σωλήνα ή στη σφράγιση του αλουμινόχαρτου. Χτυπήστε απαλά κάθε σωληνάριο σε μια σκληρή επιφάνεια για να βεβαιωθείτε ότι όλο το προϊόν βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου.
- Η εμφάνιση του μίγματος της αντίδρασης σε σταθεροποιημένη μορφή, συνήθως στον πυθμένα του σωληναρίου, η οποία διαφέρει από τη συνήθη (χωρίς κωνικό σχήμα, ανομοιογενής, μικρότερο/μεγαλύτερο μέγεθος ή/και χρώμα που διαφέρει από το λευκωπό), δεν τροποποιεί τη λειτουργικότητα του τεστ.
- Η ποιότητα του τεστ εξαρτάται από την ποιότητα του δείγματος. Πρέπει να υπάρχει σωστά εξαχθέν νουκλεϊκό οξύ από τα αναπνευστικά δείγματα.
- Ενδέχεται να εντοπιστούν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα στόχου, κάτω από το όριο ανίχνευσης, αλλά τα αποτελέσματα ενδέχεται να μην είναι δυνατόν να αναπαραχθούν.
- Υπάρχει πιθανότητα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης μόλυνσης από SARS-CoV-2, είτε από δείγματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις RNA-στόχου είτε μόλυνσης εξαιτίας προϊόντων PCR από προηγούμενες αντιδράσεις.
- Οι συγκεκριμένοι συνδυασμοί εκκινητών και ανιχνευτών για την ανίχνευση των διατηρημένων περιοχών του γονιδίου *N* που χρησιμοποιούνται στο κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System έχουν σχεδιαστεί βάσει της ανάλυσης του CDC των ΗΠΑ για την ειδική ανίχνευση του SARS-CoV-2 μέσω της ενίσχυσης δύο μοναδικών περιοχών του γονιδίου *N*. Δεν εμφανίζουν σημαντικές συνδυασμένες ομολογίες με το ανθρώπινο γονιδίωμα, την ανθρώπινη μικροχλωρίδα, τον SARS-CoV ή άλλους κορωνοϊούς, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αναμενόμενα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από διάφορους παράγοντες και τους συνδυασμούς τους, όπως:
  - Ακατάλληλες μέθοδοι συλλογής, μεταφοράς, αποθήκευσης ή/και χειρισμού των δειγμάτων.
  - Ακατάλληλες διαδικασίες επεξεργασίας (συμπεριλαμβανομένης της εξαγωγής RNA).
  - Υποβάθμιση του ιογενούς RNA κατά την αποστολή, την αποθήκευση ή/και την επεξεργασία του δείγματος.
  - Μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στις περιοχές δέσμευσης εκκινητών ή ανιχνευτών που μπορεί να επηρεάσουν την ανίχνευση νέων ή άγνωστων παραλλαγών του SARS-CoV-2.
  - Ιογενές φορτίο στο δείγμα κάτω από το όριο ανίχνευσης για την ανάλυση.
  - Παρουσία αναστολέων RT-qPCR ή άλλων τύπων ουσιών που δημιουργούν παρεμβολές. Δεν έχουν αξιολογηθεί οι επιπτώσεις των εμβολίων, των αντι-ϊικών θεραπειών, των αντιβιοτικών, των χημειοθεραπευτικών ή των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη του COVID-19 ή που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της θεραπείας της λοίμωξης.
  - Μη τήρηση των οδηγιών χρήσης και της διαδικασίας ανάλυσης.

- Η ενίσχυση μίας μεμονωμένης θέσης-στόχου ή ακόμα και τα τυχαία θετικά αποτελέσματα υποδεικνύουν μια ελαφρώς διαφορετική απόδοση ενίσχυσης της θέσης-στόχου του γονιδίου *N*. Τα δείγματα με χαμηλό ιογενές φορτίο μπορεί να οδηγήσουν σε ενίσχυση μίας μεμονωμένης θέσης *N*. Σε περίπτωση αμφιβολίας, συνιστάται να απευθυνθείτε σε ένα εργαστήριο αναφοράς για περαιτέρω τεστ, εάν ενδείκνυται κλινικά.
- Ορισμένα δείγματα μπορεί να μην καταδείξουν καμπύλες ενίσχυσης *RNase P* εξαιτίας του χαμηλού αριθμού ανθρώπινων κυττάρων στο αρχικό κλινικό δείγμα. Ένα αρνητικό σήμα IC δεν αποκλείει την παρουσία RNA του SARS-CoV-2 σε κλινικό δείγμα.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα δεν υποδεικνύει κατ' ανάγκη την παρουσία βιώσιμων ιών ή ότι οι εν λόγω ιοί είναι μολυσματικοί ή αποτελούν τους αιτιολογικούς παράγοντες για τα κλινικά συμπτώματα. Ωστόσο, ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την παρουσία ιικών αλληλουχιών-στόχων (γονίδια *N*).
- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη μόλυνση από τον SARS-CoV-2 και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μοναδική βάση για τη θεραπεία ή για άλλες αποφάσεις διαχείρισης ασθενών. Δεν έχουν προσδιοριστεί οι βέλτιστοι τύποι δειγμάτων και ο χρονισμός για τα μέγιστα ιογενή επίπεδα κατά τη διάρκεια των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον SARS-CoV-2. Η συλλογή πολλαπλών δειγμάτων (τύπων και χρονικών σημείων) από τον ίδιο ασθενή ενδέχεται να είναι απαραίτητη για την ανίχνευση του ιού.
- Εάν οι διαγνωστικές εξετάσεις για άλλες αναπνευστικές ασθένειες είναι αρνητικές και η κλινική εικόνα με τις επιδημιολογικές πληροφορίες του ασθενούς υποδηλώνουν ότι είναι πιθανή η μόλυνση από SARS-CoV-2, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος και να συζητηθεί η επανεξέταση του ασθενούς.
- Σε περίπτωση εμφάνισης Μη επιλυμένων, Ασαφών ή Ατελών αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το kit ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, θα χρειαστεί επανάληψη του τεστ. Μη επιλυμένα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην παρουσία αναστολέων στο δείγμα ή σε λανθασμένη επανυδάτωση λυοφιλοποιημένου σωλήνα μείγματος αντίδρασης. Εάν υπάρχει βλάβη οργάνου, θα προκύψουν Ασαφή ή Ατελή αποτελέσματα.

## 11. Ποιοτικός έλεγχος

Το kit ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System περιέχει έναν ενδογενή εσωτερικό μάρτυρα (IC) σε κάθε σωλήνα αντίδρασης, ο οποίος επιβεβαιώνει τη σωστή εκτέλεση της τεχνικής.

## 12. Χαρακτηριστικά απόδοσης

### 12.1. Κλινική ευαισθησία και ειδικότητα

Η κλινική απόδοση του VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ελέγχθηκε με τη χρήση ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων και στοματοφαρυγγικών επιχρισμάτων από ασθενείς που θεωρούνται ύποπτα κρούσματα λοίμωξης του αναπνευστικού. Τα αποτελέσματα είχαν ως εξής:



	Θέση	Τύπος δείγματος	Ροή εργασιών	Στόχος
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit χρησιμοποιώντας το KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Πίνακας 7. Θέση, τύπος δείγματος, ροή εργασιών και στόχος.

Οι αληθώς θετικές και αρνητικές τιμές, οι ψευδώς θετικές και αρνητικές τιμές, η ευαισθησία και οι τιμές εξειδίκευσης για το VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System υπολογίστηκαν σε σχέση με κάθε συγκριτική ανάλυση, όπως παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες:

Θέση	Συγκριτική ανάλυση	Στόχος	TP	TN	FP	FN	Ευαισθησία	Εξειδίκευσης
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*

Πίνακας 8. Αληθώς θετικές και αρνητικές τιμές, ψευδώς θετικές και αρνητικές τιμές, τιμές ευαισθησίας, εξειδίκευσης για το VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\*Εφόσον δεν αναλύθηκαν αρνητικά δείγματα, δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί η εξειδίκευση του τεστ.

Για να αξιολογηθεί η συμβατότητα σε διαφορετικές μήτρες δειγμάτων (ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, στοματοφαρυγγικό επίχρισμα και ρινοφαρυγγικό/στοματοφαρυγγικό επίχρισμα σε VTM από την Vircell), διεξήχθη μελέτη συμβατότητας. Τα ανακτηθέντα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τρεις διαφορετικές μήτρες δειγμάτων ήταν συμβατές με το αντιδραστήριο SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Αξιολογήθηκε η απόδοση του VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System με δείγματα σιέλου. Ελέγχθηκαν μεμονωμένα αρνητικά δείγματα σιέλου εμπλουτισμένα με γνωστή συγκέντρωση κατεψυγμένης, ποσοτικοποιημένης και θερμικά αδρανοποιημένης καλλιέργειας του νέου κορωνοϊού 2019, του στελέχους:2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK). Η αξιολόγηση σχεδιάστηκε να διεξαχθεί με 30 θετικά δείγματα (20 δείγματα επί 2 όρια ανίχνευσης (2xLoD), που ισοδυναμούν με 0,53 αντίγραφα γονιδιώματος (GC)/μL, και 10 δείγματα επί 5 όρια ανίχνευσης (5xLoD), που ισοδυναμούν με 1,32 αντίγραφα γονιδιώματος (GC)/μL) και 10 αρνητικά δείγματα. Αυτή η ανάλυση διεξήχθη με την προσθήκη δείγματος όγκου 750 μl για κάθε περίπτωση στο Sample Buffer Tube (SBT) του κιτ εξαγωγής TNA-3 Extraction Kit και εκτελέστηκε σε λειτουργία πλήρους επεξεργασίας (Αυτοματοποιημένη εξαγωγή και ενίσχυση PCR) χρησιμοποιώντας το BD MAX™ ExK™ TNA-3.



Το ποσοστό συμφωνίας υπολογίστηκε ως προς το αναμενόμενο αποτέλεσμα για κάθε μεμονωμένο δείγμα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Δείγμα σιέλου	Συμφωνία
Θετικό δείγμα (2xLoD)	97.5%
Θετικό δείγμα (5xLoD)	100%
Αρνητικό δείγμα	100%

Πίνακας 9. Ποσοστό συμφωνίας του VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System με δείγματα σιέλου.

Ως εκ τούτου, τα δείγματα σιέλου ήταν συμβατά με το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

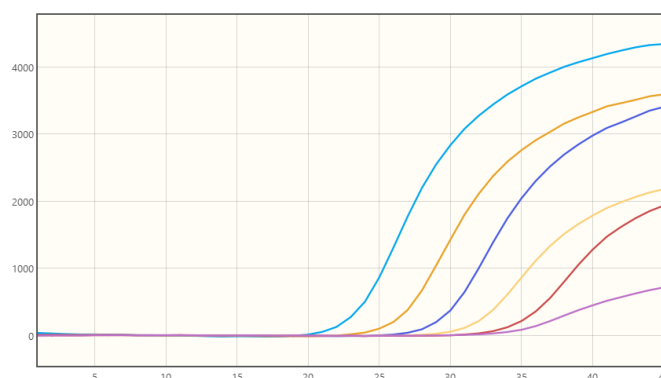
Τα αποτελέσματα δείχνουν ένα υψηλό ποσοστό συμφωνίας όσον αφορά την ανίχνευση του SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Ευαισθησία ανάλυσης

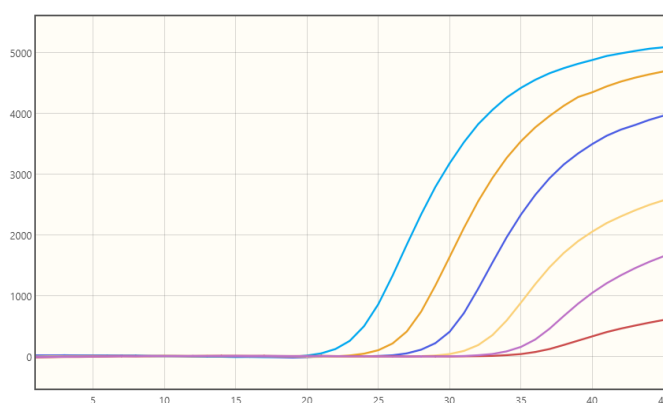
Το κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System έχει όριο ανίχνευσης  $\geq 5$  αντίγραφα γονιδιώματος ανά αντίδραση σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα και  $\geq 10$  αντίγραφα γονιδιώματος ανά αντίδραση σε δείγματα σιέλου, με ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων  $\geq 95\%$ .

*Σημείωση: Το όριο ανίχνευσης σε δείγματα σιέλου υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας δείγμα όγκου 750  $\mu$ L (με αραιώση 1:3 σε VTM).*

Εικόνα 2. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \cdot 10^4$ - $9,9 \cdot 10^0$  και  $5,0 \cdot 10^0$  αντίγραφα ανά αντίδραση) στο σύστημα BD MAX™ (κανάλι 475/520 (FAM)).



Εικόνα 3. Σειρά αραιώσης της εκτέλεσης προτύπου SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9,9\*10<sup>4</sup>-9,9\*10<sup>0</sup> και 5,0\*10<sup>0</sup> αντιγραφα ανά αντίδραση) στο σύστημα BD MAX™ (κανάλι 630/665 (Cy5)).



### 12.3. Αναλυτική ειδικότητα

Η ειδικότητα της ανάλυσης SARS-CoV-2 (N1 + N2) επιβεβαιώθηκε εξετάζοντας ένα πάνελ αποτελούμενο από διαφορετικούς μικροοργανισμούς που αντιπροσωπεύουν τα πιο κοινά αναπνευστικά παθογόνα. Δεν ανιχνεύθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των ακόλουθων μικροοργανισμών που εξετάστηκαν:

Έλεγχος διασταυρούμενης αντιδραστικότητας					
Τύποι ανθρώπινου αδενοϊού 1-5, 8, 15, 31, 40 και 41	-	Ιός Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Ανθρώπινος Βοκαϊός	-	Ιός Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Ιός Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Ιός Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Ανθρώπινος μεταπνευμονιός A και B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Ιός Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Ιός Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Ιός Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> μη ανθεκτική στη ριφαμπίνη	-
Γονότυπος <i>Chlamydia psittaci</i> A και C	-	Ιός Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Ιοί ανθρώπινης παραϊνφλουένζας 1, 2, 3 και 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Ιός Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Τύπος A1 και g885652	-
Ανθρώπινος κορωνοϊός 229E, OC43, NL63 και HKU1	-	Ιός Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/2016 (H5N8)	-	Ανθρώπινος ρινοϊός, τύπος C	-
Κορωνοϊός MERS	-	Ιός Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> υποκατηγ. <i>aureus</i>	-
Στέλεχος κορωνοϊού SARS Frankfurt 1	-	Ιός Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Εντεροϊός 68 και 71	-	Ιός Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 11 και 30	-	Ιός Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Εντεροϊός Coxsackievirus A24, A9 και B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV) A και B	-

Πίνακας 10. Παθογόνοι μικροοργανισμοί αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη

## 12.4. Αναλυτική αντιδραστικότητα










Η αντιδραστικότητα του κιτ ανίχνευσης VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System αξιολογήθηκε έναντι RNA από το στέλεχος ανθρώπινου κορωνοϊού 2019-nCoV BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, από το στέλεχος ανθρώπινου κορωνοϊού 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER και συνθετικούς μάρτυρες RNA για τέσσερα μεταλλάξεις του ιού SARS-CoV-2: SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, B.1.1.7\_710528 και B.1.1.7\_601443, με θετικό αποτέλεσμα.

## Bibliography/ Βιβλιογραφία

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/ Σύμβολα για στοιχεία και αντιδραστήρια IVD

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device Διαγνωστική συσκευή <i>In vitro</i>	 Keep dry Διατηρήστε στεγνό	 Use by Ανάλωση έως	 Manufacturer Κατασκευαστής	 <b>LOT</b> Batch code (Lot) Κωδικός παρτίδας
 <b>i</b>	Consult Instructions for Use Ανατρέξτε στις Οδηγίες χρήσης	 Temperature limitation Περιορισμός θερμοκρασίας	 Contains sufficient for <n> test Περιεχόμενο επαρκές για <n> τεστ	<b>DIL</b> Sample diluent Αραιωτικό δείγματος	 <b>REF</b> Catalog number Αριθμός καταλόγου

## Trademarks

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

Change Control / Αλλαγή μάρτυρα		
Version No. / Αρ. έκδοσης	Changes / Αλλαγές	Date/ Ημερομηνία
00	Original version/ Αρχική έκδοση.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Πίνακας αλλαγής μάρτυρα.

Revision: 21<sup>st</sup> 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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

