

**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 / Queste istruzioni per l'uso si applicano al seguente riferimento:

PRODUCT / PRODOTTO	REFERENCE / RIFERIMENTO
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. / Riferimento per il prodotto da utilizzare con il sistema 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

## Contenuto

1.	Usò previsto .....	19
2.	Introduzione e spiegazione .....	19
3.	Principi del procedimento.....	20
4.	Reagenti forniti .....	20
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi .....	21
6.	Condizioni di trasporto e conservazione .....	21
7.	Precauzioni per gli utenti.....	21
8.	Procedura di test.....	22
8.1.	Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....	22
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione dell'RNA.....	23

---

8.3.	Protocollo PCR.....	24
9.	Interpretazione dei risultati .....	28
10.	Limiti del test .....	30
11.	Controllo di qualità .....	31
12.	Caratteristiche del test .....	31
12.1.	Sensibilità e specificità clinica .....	31
12.2.	Sensibilità analitica.....	33
12.3.	Specificità analitica .....	33
12.4.	Reattività analitica .....	34
	Bibliography/Bibliografia .....	35
	Symbols for IVD components and reagents/ Simboli per reagenti e componenti IVD .....	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) (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	680/715
Excitation Channel	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 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	✓

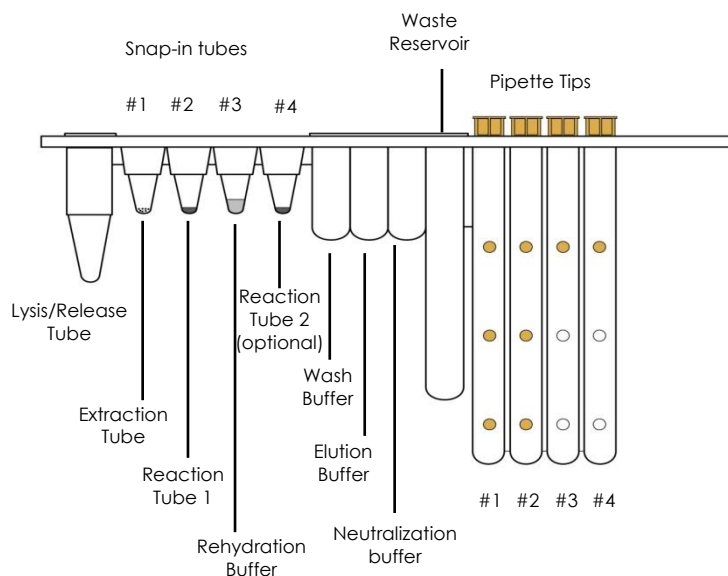
Table 5. PCR protocol.

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 <sup>1</sup></b>
+ <sup>2</sup>	+/- <sup>1</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>1,2</sup></b>
-	+/- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>1,2</sup></b>
-	+ <sup>3</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected<sup>3</sup></b>
-	- <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.<sup>3</sup></b>
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).

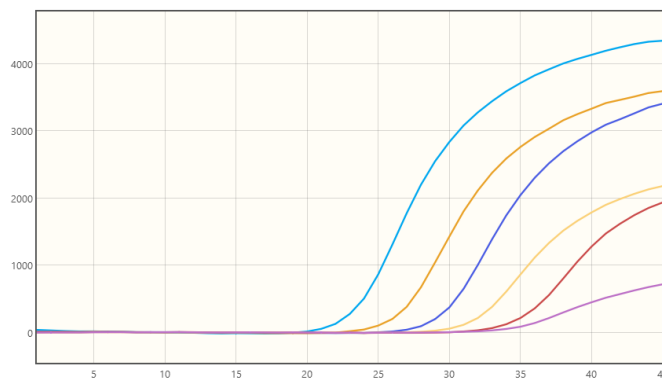
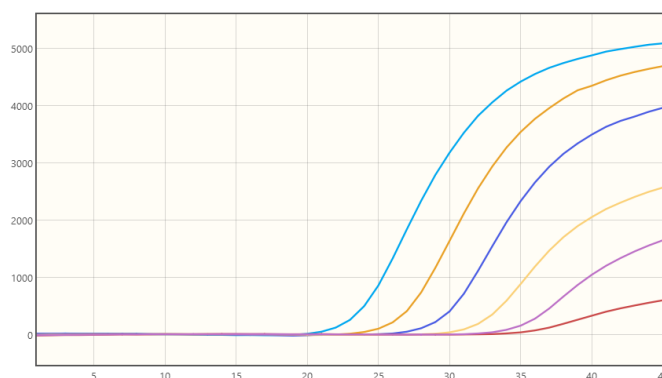


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9.9 \times 10^4$ - $9.9 \times 10^0$  and  $5.0 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 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.

## ITALIANO

---

### 1. Uso previsto

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test RT-PCR in tempo reale automatico per l'identificazione qualitativa dell'RNA nel SARS-CoV-2 in campioni salivari e nasofaringei/orofaringei di soggetti in cui il loro medico sospetta la presenza della malattia da Coronavirus 2019 (COVID-19). Questo test è destinato ad essere utilizzato come aiuto nella diagnosi della COVID-19 in combinazione con i fattori di rischio clinici ed epidemiologici. Questo test utilizza il sistema BD MAX™ per l'estrazione automatica dell'RNA e successivamente del RT-PCR in tempo reale, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e monouso del sistema BD MAX™. L'RNA viene estratto da campioni utilizzando la RT-PCR e il DNA complementare (cDNA) viene sintetizzato e amplificato mediante sonde marcate con un colorante fluorescente specifico per il SARS-CoV-2.

### 2. Introduzione e spiegazione

I Coronavirus sono virus a RNA non segmentato a senso positivo dotati di pericapside che appartengono alla famiglia dei *Coronaviridae* [1,2]. Esistono sei specie di coronavirus noti per causare malattie nell'uomo [2]. Quattro virus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causano i sintomi della comune influenza e altri due (sindrome respiratoria acuta grave da Coronavirus (SARS-CoV) e sindrome respiratoria mediorientale da Coronavirus (MERS-CoV)) sono zoonotici e causano complicanze più gravi [2]. Il SARS-CoV e il MERS-CoV hanno causato oltre 10.000 casi cumulativi negli ultimi due decenni, con un tasso di mortalità del 34% per il MERS-CoV e del 10% per il SARS-CoV [1,3].

Nel dicembre 2019, alcune persone che lavoravano o vivevano nella zona intorno al mercato del pesce Huanan di Wuhan, nella provincia di Hubei, in Cina, hanno riportato una polmonite di origine sconosciuta [2,4]. Le accurate analisi di sequenziamento dei campioni respiratori indicavano un nuovo coronavirus, denominato inizialmente nuovo Coronavirus 2019 (2019-nCoV) e successivamente SARS-CoV-2 [5].

È stato dimostrato che il SARS-CoV-2 è trasmissibile da uomo a uomo, anche durante il periodo di incubazione in cui non si manifestano i sintomi, e che causa una malattia respiratoria grave simile a quelle prodotte dal SARS-CoV [1,6,7,8]. Nonostante la polmonite sia la principale malattia associata, alcuni pazienti hanno sviluppato polmonite grave, edema polmonare, sindrome da distress respiratorio acuto, insufficienza multiorganica e morte [1,4]. I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) ritengono che i sintomi del SARS-CoV-2 compaiano tra i 2 e i 14 giorni dopo l'esposizione, con febbre o brividi, tosse, spossatezza, anoressia, mialgia e dispnea tra i sintomi più comuni [1,4,6,9]. Sintomi meno comuni sono infiammazione della gola, congestione nasale, cefalea, diarrea e vomito [1,4]. È stata inoltre riportata la perdita dell'odorato (anosmia) o la perdita del gusto (ageusia) che precedono l'insorgenza dei sintomi respiratori [9]. I soggetti in età avanzata e le persone con patologie mediche concomitanti, come ad esempio patologie cardiache o polmonari o diabete, sembrano avere un rischio maggiore di sviluppare complicazioni più gravi associate alla COVID-19 [10].

La diagnosi di COVID-19 viene effettuata riconoscendo in anticipo le tradizionali cause di polmonite e viene eseguita attraverso un sequenziamento di nuova generazione o i metodi di RT-PCR in tempo reale [1,11]. Attualmente sono disponibili diversi test in grado di rilevare il SARS-CoV-2, come i test del CDC cinese (target

genici *ORF1ab* e *N*), del *Charité* tedesco (target genici *RdRP* e *E*) o del CDC statunitense (due target nel gene *N*) [12].

Per l'identificazione del SARS-CoV-2 il CDC raccomanda di utilizzare campioni delle prime vie respiratorie [tamponi nasofaringei (NP) e orofaringei (OP), tampone dei turbinati centrali nasali, tamponi nasali, lavaggio/aspirato nasofaringeo o lavaggio/aspirato nasale (NW) e campioni di saliva prelevati principalmente da un medico) e/o campioni delle vie respiratorie profonde (espettorato, aspirato endotracheale o lavaggio broncoalveolare nei pazienti con patologie respiratorie più gravi] [11]. Per monitorare la presenza del virus, possono anche essere raccolti campioni chimici come sangue, urine e feci [11,12].

### 3. Principi del procedimento

Il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è progettato per il rilevamento qualitativo dell'RNA di SARS-CoV-2 in tamponi nasofaringei/orofaringei e campioni salivari. Il rilevamento si esegue con un test di RT-PCR in tempo reale in un solo passaggio, in cui la trascrizione e la successiva amplificazione della specifica sequenza target avvengono nella stessa provetta. L'RNA target isolato viene quindi trascritto, generando un DNA complementare tramite la trascrittasi inversa, seguita dall'amplificazione di due regioni conservate del gene *N* (*N1* e *N2*) utilizzando primer specifici e sonde marcate a fluorescenza.

Il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. Questa fluorescenza può essere misurata sul sistema BD MAX™.

Il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un dosaggio PCR in tempo reale (sonde/primer specifici, dNTPS, tampone, polimerasi, trascrittasi inversa) in formato stabilizzato e un controllo interno endogeno per monitorare il processo di estrazione/di inibizione dell'attività della polimerasi. Il dosaggio utilizza un gene *housekeeping* umano come controllo interno (CI) endogeno (gene *RNasi P* umano). I geni *housekeeping* umani partecipano alla manutenzione di base delle cellule e, di conseguenza, si presume che siano presenti in tutte le cellule nucleate umane e che mantengano livelli di espressione relativamente costanti.

Obiettivo	Canale	Gene
SARS-CoV-2	475/520	gene <i>N</i> (regioni <i>N2</i> )
SARS-CoV-2	630/665	gene <i>N</i> (regioni <i>N1</i> )
Controllo interno (CI) endogeno	530/565	gene <i>RNasi P</i> umano

Tabella 1. Obiettivo, canale e geni.

### 4. Reagenti forniti

Il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Codice a barre	Quantità
SARS-CoV-2 (N1 +N2) reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno endogeno in un formato stabilizzato	Sigillo 1G	2 confezioni da 12 provette trasparente
Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparente

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con N. di cat. VS-NCO324 (444215).

## 5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Strumenti per la PCR in tempo reale: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod:442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

## 6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo la loro apertura, le confezioni che contengono le provette di reazione possono essere utilizzate fino a un massimo di 28 giorni.

## 7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti e tecnici di laboratorio o sanitari, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.

- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il sistema BD MAX™ non siano contaminati. Evitare in ogni momento la contaminazione dei reagenti con microrganismi e ribonucleasi (RNAsi)/desossiribonucleasi (DNAsi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNAsi/DNAsi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la cartuccia BD MAX™ PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) dopo l'uso. I sigilli della cartuccia BD MAX™ PC (BD MAX™ PCR Cartridge) sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Disegnare un flusso unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e / o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- "In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" non richiedono una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheets) dei materiali a causa della loro classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contengono sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione".
- Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

## 8. Procedura di test

### 8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

Il VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato testato su tamponi nasofaringei/orofaringei raccolti in viral transport media (VTM) (Vircell S.L., Spagna); tamponi nasofaringei raccolti 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) e IMPROVIRAL™ Viral

Preservative Medium (VPM) di Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; e campioni di saliva raccolti in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) o IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Altre tipologie di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i campioni respiratori e di saliva devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) ed esaminati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 72 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 72 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤-20 °C o inferiore. È consigliato utilizzare campioni appena raccolti per il test. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C a 72 ore oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I tamponi nasofaringei/orofaringei e i campioni di saliva devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per i dettagli, consultare le CDC guideline (Specimen collection guidelines. Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e linee guida provvisorie per la raccolta, la manipolazione e l'analisi di campioni clinici di COVID-19. Sito web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) e linee guida IDSA (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. Preparazione del campione ed estrazione dell'RNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

Quando si utilizzano campione nasofaringeo/orofaringeo:

1. Pipettare 400-750 µl di campione nasofaringeo/orofaringeo raccolto in un mezzo di trasporto virale (VTM) o in BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

In caso di utilizzo di campioni di saliva raccolti in terreno di trasporto:

1. i campioni di saliva devono essere prelevati nel terreno di trasporto virale (VTM), nel terreno di trasporto virale universale BD™ (BD™ Universal Viral Transport) (UVT) o nel terreno di conservazione virale IMPROVIRAL™ (IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium) (VPM) con un rapporto di 1:3 (saliva:terreno). Miscelare con un vortex per 1 minuto a velocità elevata. Pipettare 750 µL di campione in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

In caso di utilizzo di campioni di saliva puri:

1. unire la saliva al terreno di trasporto virale (VTM), al terreno di trasporto virale universale BD™ (BD™ Universal Viral Transport) (UVT) o al terreno di conservazione virale IMPROVIRAL™ (IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium) (VPM) in modo da ottenere un rapporto finale tra la saliva e il terreno di 1:3. Miscelare con un vortex per 1 minuto a velocità elevata. Pipettare 750 µL di campione in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

### 8.3. Protocollo PCR

Nota: Consultare il manuale utente del sistema BD MAX™ per istruzioni dettagliate.

#### 8.3.1. Creazione di un programma di test PCR per VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se è stato già creato il test per VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" (Esegui) del sistema BD MAX™, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il proprio test: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
  - b. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX™. In questo caso selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Utente definito) e regolare il volume del campione a 950 µL.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:
  - a. Codice a barre Snap-In 2: 1G [riguarda la SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube].
  - b. Codice a barre Snap-In 3: 11 (riguarda la Rehydration Buffer tube).
  - c. Codice a barre Snap-In 4: un'altra provetta di reazione VIASURE (sigillo diverso) se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato master mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).



9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).

- a. Nota: Il prodotto può essere utilizzato in combinazione con un test aggiuntivo VIASURE per BD MAX™. In questo caso "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Fasi del test) devono essere completate per entrambe le posizioni Snap-In 2 (verde) e Snap-In 4 (blu).

Channel (Canale)	Alias (Alias)	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	Ct Min (Ct min)	Ct Max (Ct max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Obiettivo N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	IC endogeno	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Obiettivo N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabella 3. PCR settings (Impostazioni di PCR).

Nota: si consiglia di impostare i valori minimi della soglia sopraelencati per ciascun canale come punto di partenza; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross-talk spettrale) (Tabella 4):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0

Tabella 4. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Reverse transcription (Trascrizione inversa)	Attendere	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	Attendere	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e allineamento/Estensione (Raccolta dati))	2 Temperatura	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabella 5. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

### 8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una striscia di reagente individuale dal kit di estrazione (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit). Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo della provetta, quindi posizionarle sulla griglia del sistema BD MAX™.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione (BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (sigillo bianco)) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (sigillo 1G) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
  - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
  - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo la provetta.
    - i. Nota: se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione VIASURE (sigillo diverso) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tube (sigillo 11) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
  - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo la provetta.



### 8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...).
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

## 9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del sistema BD MAX™.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al sistema BD MAX™.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

SARS-CoV-2 (Obiettivo N2) (475/520)	Controllo interno endogeno (530/565)	SARS-CoV-2 (Obiettivo N1) (630/665)	Interpretazione
+	+/- <sup>1</sup>	+	<b>SARS-CoV-2 gene N RNA Rilevato<sup>1</sup></b>
+ <sup>2</sup>	+/- <sup>1</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 gene N RNA Rilevato<sup>1,2</sup></b>
-	+/- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	<b>SARS-CoV-2 gene N RNA Rilevato<sup>1,2</sup></b>
-	+ <sup>3</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 gene N RNA Non Rilevato<sup>3</sup></b>
-	- <sup>3</sup>	-	<b>Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.<sup>3</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.</b>
INC	INC	INC	<b>Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.</b>

Tabella 6. Interpretazione.

+: Curva di amplificazione presente  
 -: Senza curva di amplificazione

**1** Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il controllo interno endogeno (CI) a volte può non mostrare un segnale di amplificazione. A volte il rilevamento del CI non è necessario perché la presenza di un elevato numero di copie del target può provocare l'amplificazione preferenziale di acidi nucleici target-specifici.

**2** Se si amplifica un solo sito target del gene *N*, verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza. In caso di interpretazione dubbia, in base al materiale disponibile si raccomanda inoltre quanto segue:

- Estrarre nuovamente e ripetere il test di un'altra aliquota dello stesso campione (se possibile, aumentare il volume del campione a 750 µl) oppure
- Ottenere un nuovo campione e ripetere il test.

**3** Qualora i siti target di SARS-CoV-2 fossero negativi, il CI devono mostrare un segnale di amplificazione con un Ct inferiore a 35. Il valore di Ct può essere estremamente variabile poiché il controllo interno endogeno è un gene *housekeeping* umano che dovrebbe essere presente in tutte le cellule enucleate umane del campione originale. Qualora il segnale fosse assente o vi fosse un valore di Ct  $\geq 35$  del controllo interno endogeno, il risultato viene considerato come "non risolto" ed è necessario ripetere il test

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso, la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare corrette prestazioni di ciascun passaggio del test RT-qPCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

## 10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi nasofaringei/orofaringei e i campioni di saliva raccolti in un VTm.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo la provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo la provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni respiratori.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione crociata con campioni con SARS-CoV-2 quando entrambi i campioni contengono concentrazioni elevate di RNA target oppure per la contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Il primer specifico e le combinazioni di sonde per il rilevamento delle regioni conservate del gene *N* usato nel VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono stati sviluppati in base al dosaggio della CDC statunitense per l'identificazione specifica del SARS-CoV-2 mediante amplificazione di due regioni uniche del gene *N*. Non mostrano omologie combinate significative con il genoma umano, la microflora umana, il SARS-CoV o altri coronavirus, che potrebbero portare a falsi positivi prevedibili.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
  - Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni in corretto.
  - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di RNA).
  - Degradazione dell'RNA virale durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
  - Le mutazioni o il polimorfismo del primer o delle regioni di legame della sonda possono influenzare il rilevamento di nuove varianti o di varianti sconosciute del SARS-CoV-2.
  - Carica virale del campione al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio.
  - Presenza di inibitori della RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenze. L'impatto di vaccini, farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o farmaci immunosoppressori utilizzati per prevenire il COVID-19 o utilizzati durante il trattamento dell'infezione non è stato valutato.
  - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- L'amplificazione del sito di un unico target o anche risultati positivi casuali indicano un valore di amplificazione leggermente differente del sito obiettivo del gene *N*. L'utilizzo di campioni con bassa carica virale può portare all'amplificazione di un singolo obiettivo del gene *N*. In caso di dubbio, si raccomanda di consultare un laboratorio di riferimento per ulteriori test, se clinicamente indicato.

- Alcuni campioni possono non mostrare curve di amplificazione dell'RNAsi P a causa del basso numero di cellule umane nel campione clinico originale. Un segnale negativo del CI non esclude la presenza dell'RNA virale del SARS-CoV-2 in un campione clinico.
- Il risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza di virus vivo e non implica che il virus sia infettivo o che sia l'agente causale dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza di sequenze virali obiettivo (*geni N*).
- I risultati negativi non escludono un'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardante la gestione del paziente. Non sono stati definiti i tipi di campioni ottimali e il periodo ottimale dei livelli virali picco durante le infezioni causate dal SARS-CoV-2. Per rilevare il virus può essere necessario prelevare più campioni (tipi e periodo di campionamento) nello stesso paziente.
- Se i test diagnostici per altre patologie respiratorie sono negativi e la presentazione clinica e le informazioni epidemiologiche del paziente indicano la possibilità di un'infezione da SARS-CoV-2, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e discutere la ripetizione del test.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o ad una reidratazione incorretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

## 11. Controllo di qualità

Il VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un controllo interno endogeno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica.

## 12. Caratteristiche del test

### 12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state testate utilizzando tamponi nasofaringei e orofaringei di campioni con sospetto di infezione respiratoria. I risultati sono stati i seguenti:

	Sede	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	tamponi nasofaringei	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	tamponi nasofaringei	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit con KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tabella 7. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori positivi e negativi reali, i valori fasi positivi e falsi negativi, i valori di sensibilità e specificità per VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono stati calcolati in relazione a ciascun dosaggio di confronto, come riportato nelle seguenti tabelle:

Sede	Dosaggio di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
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*

Tabella 8. Valori positivi e negativi reali, valori falsi positivi e falsi negativi, sensibilità, specificità per VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\*Poiché i campioni negativi non sono stati analizzati non è stato possibile calcolare la specificità del test.

Per valutare la compatibilità di diversi matrici di campioni (tampone nasofaringeo, tampone orofaringeo e tampone nasofaringeo/orofaringeo in VTM di Vircell), è stato condotto uno studio sulla compatibilità. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tre matrici di campioni diverse erano compatibili con SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Sono state valutate le prestazioni di VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con campioni di saliva. Sono stati analizzati singoli campioni di saliva negativi in seguito a spike con una concentrazione nota del nuovo Coronavirus 2019 in coltura inattivato con calore, quantificato e congelato, ceppo 2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK). È stata progettata una valutazione da condurre su 30 campioni positivi (20 campioni 2 volte il LoD (2xLoD) equivalenti a 0,53 copie genomiche (GC)/ $\mu$ L e 10 campioni 5 volte il LoD (5xLoD) equivalenti a 1,32 copie genomiche (GC)/ $\mu$ L) e 10 campioni negativi. Il dosaggio è stato eseguito utilizzando un volume di campione di 750  $\mu$ L di ciascuna condizione aggiunta al Sample Buffer Tube (SBT) del TNA-3 Extraction Kit ed è stato condotto in piena modalità operativa (estrazione automatizzata e amplificazione PCR) utilizzando BD MAX™ ExK™ TNA-3.

La percentuale di concordanza è stata calcolata in relazione al risultato atteso per ciascun campione individuale e i risultati sono stati riportati nella seguente tabella:

Campione di saliva	Concordanza
Campione positivo (2xLoD)	97.5%
Campione positivo (5xLoD)	100%
Campione negativo	100%

Tabella 9. Percentuale di concordanza di VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con campioni di saliva.

In conclusione, i campioni di saliva erano compatibili con VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.



I risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevare il SARS-CoV-2 mediante il VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Sensibilità analitica

Il VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System presenta un limite di rilevamento  $\geq 5$  copie di genoma per reazione su tamponi nasofaringei e  $\geq 10$  copie di genoma per reazione su campioni salivari con un tasso di positività  $\geq 95\%$ .

*Nota: il limite di rilevamento su campioni salivari è stato calcolando utilizzando un volume di campione di 750  $\mu\text{L}$  (diluizione 1:3 in VTM).*

Figura 2. Serie di diluizioni del SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \cdot 10^4$ - $9,9 \cdot 10^0$  e  $5,0 \cdot 10^0$  copie di genoma per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ [canale 475/520 (FAM)].

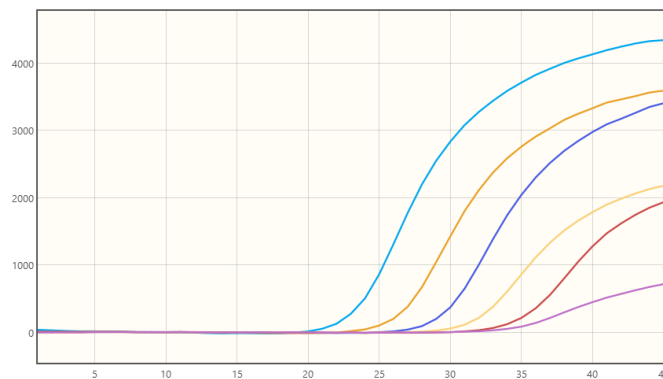
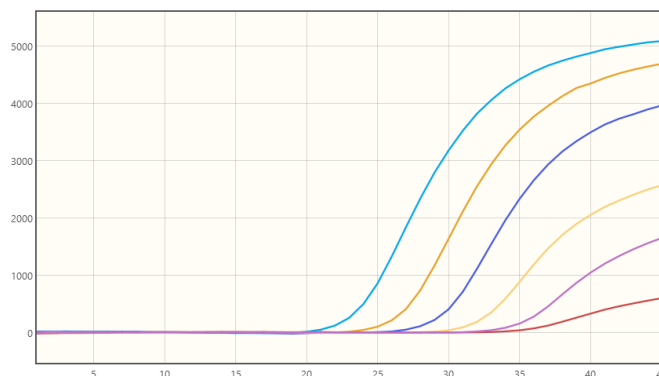


Figura 3. Serie di diluizioni del SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \cdot 10^4$ - $9,9 \cdot 10^0$  e  $5,0 \cdot 10^0$  copie di genoma per reazione) realizzata sul sistema BD MAX™ [canale 630/665 (Cy5)].



## 12.3. Specificità analitica

La specificità del test SARS-CoV-2 (N1 + N2) è stata confermata testando un pannello formato da diversi organismi che rappresentano i più comuni patogeni respiratori. Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata tra i seguenti microrganismi testati:

Test di reattività incrociata					
Adenovirus umano tipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavirus umano	-	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	-	Metapneumovirus umano A e 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 resistente alla rifampicina	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A e C	-	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipo A1 e g885652	-
Coronavirus umani 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Rhinovirus umano di tipo C	-
Coronavirus MERS	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus ceppo Frankfurt 1	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 e 71	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 11 e 30	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Cocksackievirus A24, A9 e B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus respiratorio sinciziale (RSV) A e B	-

Tabella 10. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

## 12.4. Reattività analitica











La reattività del VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata utilizzando RNA derivato dal ceppo di 2019-nCoV umano BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, dal ceppo di 2019-nCoV umano 2019-nCoV/Italy-INMI1, dal ceppo di SARS-CoV-2 2019nCoV/USA-WA1/2020, dal ceppo di SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, dal ceppo di SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, dal ceppo di SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER e dai controlli di RNA sintetico per quattro varianti del virus SARS-CoV-2: isolato SARS-CoV-2 Australia/VIC01/2020, isolato SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, B.1.1.7\_710528 e B.1.1.7\_601443 hanno mostrato risultato positivo.

## Bibliography/Bibliografia

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed 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/ Simboli per reagenti e componenti IVD

 <b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>	 Keep dry Mantenere asciutto	 Use by Usare entro	 Manufacturer Produttore	 <b>LOT</b> Batch code (Lot) Codice lotto
 <b>i</b>	Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso	 Temperature limitation Limitazione temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contenuto sufficiente per <n> test	 DIL Sample diluent Diluyente	 <b>REF</b> Catalognumber Numero catalogo

## Trademarks

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

Change Control / Variazioni del controllo		
Version No. / Versione n.	Changes / Variazioni	Date / Data
00	Original version/Versione originale.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Tabella delle variazioni del controllo.

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

