

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 / Disse bruksanvisningene gjelder for følgende referanse:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERANSE
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. / Referanse for produkt som skal brukes med BD MAX™-systemet.

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

Innhold

1.	Tiltenkt bruk	19
2.	Sammendrag og forklaring	19
3.	Grunnleggende prosedyre	20
4.	Reagenser som følger med.....	20
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren	21
6.	Transport- og lagringsforhold	21
7.	Forholdsregler for brukere.....	21
8.	Test prosedyre.....	22
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	22
8.2.	Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon.....	23

8.3.	PCR Protokoll.....	23
9.	Tolkning av resultater	27
10.	Testens begrensninger	29
11.	Kvalitetskontroll	30
12.	Ytelsesegenskaper	30
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet	30
12.2.	Analytisk sensitivitet	32
12.3.	Analytisk spesifisitet	32
12.4.	Analytisk reaktivitet	33
	Bibliography/Bibliografi.....	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	35
	Trademarks.....	35

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	✓

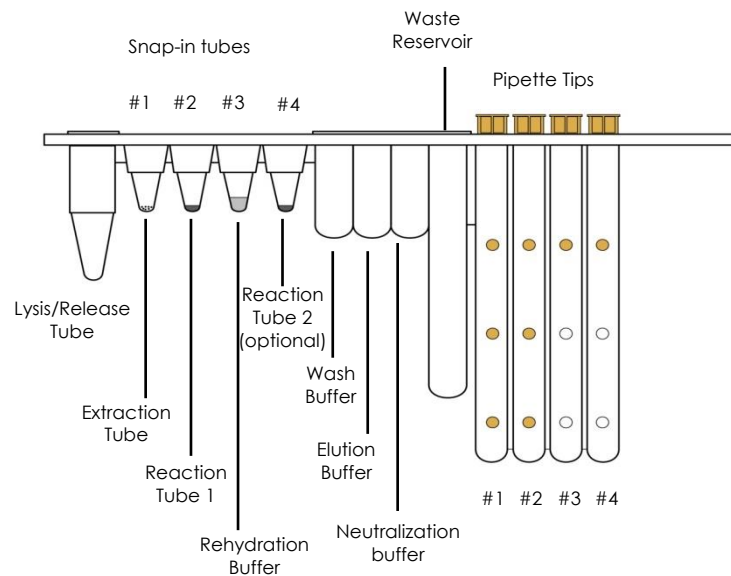
Table 5. PCR protocol.

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
+	+/- ¹	+	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ¹
+ ²	+/- ¹	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	SARS-CoV-2 N gene RNA Detected ^{1,2}
-	+ ³	-	SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected³
-	- ³	-	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.³
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

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

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

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

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

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal and oropharyngeal swabs and saliva samples, both collected in VTM.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of conserved regions of *N* gene used in VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System have been designed based on the US CDC assay for specific detection of SARS-CoV-2 by amplifying two unique regions of the *N* gene. They do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, SARS-CoV or other coronaviruses, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2 variants.

- A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
- The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A single-target site amplification or even random positive results is suggestive of slightly different amplification yield of the target sites of the *N* gene. Samples with low viral load might result in *N* single target amplification. In case of a doubt, it is recommended referring to a reference laboratory for further testing if clinically indicated.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences (*N* genes).
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by SARS-CoV-2 have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2 infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs and oropharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection. The results were as follows:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit of ≥ 5 genome copies per reaction on nasopharyngeal swabs and ≥ 10 genome copies per reaction on saliva samples with a positive rate of $\geq 95\%$.

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

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

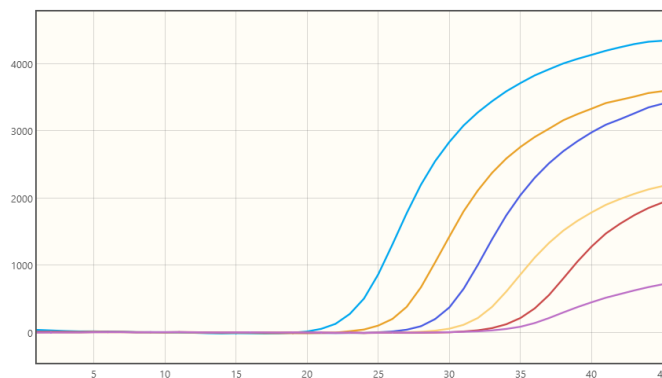
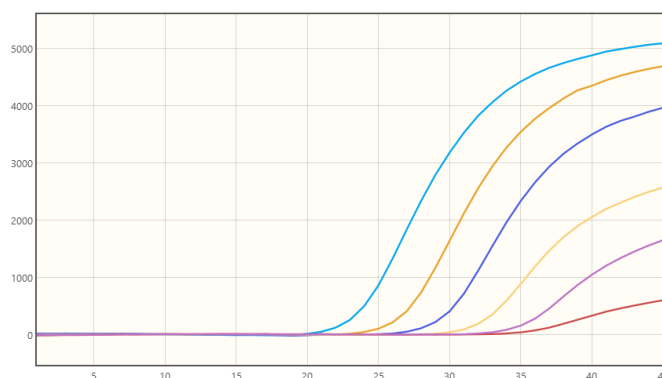


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 (N1 + N2) assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/DE-SH/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.

NORSK

1. Tiltent bruk

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatisert RT-PCR test designet for i sanntid å kvalitativt detektere RNA fra SARS-CoV-2 nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og spyttprøver, tatt av helsepersonell, fra individer med mistenkt koronavirus 2019-sykdom (COVID-19). Denne testen er ment å brukes som et hjelpemiddel ved diagnosen COVID-19 i kombinasjon med kliniske og epidemiologiske risikofaktorer. Analysen bruker BD MAX™-systemet til automatisert ekstraksjon av RNA og påfølgende sanntids RT-PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. RNA ekstraheres fra prøver, og komplementært DNA (cDNA) syntetiseres og amplifiseres ved bruk av RT-PCR og påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for SARS-CoV-2.

2. Sammendrag og forklaring

Koronavirus er kappekledd, ikke-segmenterte RNA-virus med positiv polaritet og tilhører *Coronaviridae*-familien [1,2]. Man kjenner til seks typer koronavirus som forårsaker sykdom hos mennesker [2]. Fire av virusene (229E, OC43, NL63 og HKU1) gir vanlige forkjølelssymptomer, og de andre to (severe acute respiratory syndrome koronavirus (SARS-CoV) og Middle East respiratory syndrome koronavirus (MERS-CoV)) er zoonotiske og gir mer alvorlige komplikasjoner [2]. SARS-CoV og MERS-CoV har til sammen forårsaket mer enn 10 000 tilfeller i løpet av de siste to tiårene, med mortalitetsrater på 34 % for MERS-CoV og 10 % for SARS-CoV [1,3].

Flere personer som jobbet på eller bodde rundt Huanan sjømatmarked i Wuhan i den kinesiske provinsen Hubei fikk i desember 2019 pneumoni med ukjent årsak [2,4]. Dypsekvenseringsanalyse av luftveisprøvene indikerte et nytt koronavirus, som først ble kalt "2019 nytt koronavirus" (2019-nCoV) og i den senere tid SARS-CoV-2 [5].

Overføring av SARS-CoV-2 mellom mennesker har blitt bekreftet, til og med under den symptomfrie inkubasjonsperioden, og viruset gir alvorlig luftveissykdom i likhet med de SARS-CoV forårsaket [1,6,7,8]. Selv om pneumoni er den sykdommen som hovedsakelig forbindes med viruset, har noen få pasienter utviklet alvorlig pneumoni, lungeødem, akutt lungesviktsyndrom eller flerorgansvikt og død [1,4]. Sentre for sykdomskontroll og forebygging (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) tror at symptomene på SARS-CoV-2 kan opptre etter så lite som 2 dager eller så lenge som 14 dager etter eksponering, der de vanligste symptomene er feber eller frost rier, hoste, tretthet, anoreksi, myalgi og dyspné [1,4,6,9]. Mindre vanlige symptomer er sår hals, nese tetthet, hodepine, diaré, kvalme og oppkast [1,4]. Tap av luktesans (anosmia) eller tap av smaksans (ageusia) forut for luftveissymptomene er også rapportert [9]. Eldre voksne og mennesker med alvorlig underliggende sykdom som hjerte- eller lungesykdom eller diabetes, ser ut til å ha høyere risiko for å utvikle mer alvorlige komplikasjoner fra COVID-19 sykdom [10].

Diagnostisering av COVID-19 gjøres ved tidlig påvisning av konvensjonelle årsaker til pneumoni og påvisning via nestegenerasjons sekvensering eller sanntids RT-PCR-metoder [1,11]. Flere analyser som påviser SARS-CoV-2 er på nåværende tidspunkt tilgjengelige, for eksempel kinesisk CDC (mål gener, *ORF1ab* and *N*), *Charité* – Tyskland (mål gener, *RdRP* and *E*) eller amerikansk CDC (to mål i *N* gen) [12].

CDC anbefaler penselprøver fra øvre luftveier (nasopharyngeal (NP) og oropharyngeal (OP), nasal mid-turbinate prøve, nasal prøve, nasopharyngeal skyll/aspirasjon eller nasal skyll/aspirasjon (NW) prøver og

spytprøver hovedsakelig tatt av en helsearbeider) og/eller prøver fra nedre luftveier (ekspektorat, endotracheal aspirasjon, eller bronko-alveolær lavage for pasienter med mer alvorlig luftveissykdom) for identifisering av SARS-CoV-2 [11]. I tillegg kan det innsamles andre kliniske prøver, som blod, urin og avføring, for å monitorere tilstedeværelse av viruset [11,12].

3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er designet for kvalitativ deteksjon av RNA fra SARS-CoV-2 i nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og sputtprøver. Påvisningen utføres i et trinn, sanntids RT-PCR-format, der revers transkripsjon og påfølgende amplifikasjon av den spesifikke målsekvensen skjer i samme reaksjonsrør. Det isolerte RNA-målet transkriberes og genererer komplementært DNA via revers transkriptase. Deretter amplifiseres to konserverte områder av N-gen (N1 og N2) ved hjelp av spesifikke primere og en fluorescens merkede prober.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av målmalen. Denne fluorescensen måles av BD MAX™-systemet.

Hvert rør i VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase, revers transkriptase) i et stabilisert format, samt en endogen intern kontroll til monitorering av ekstraksjonsprosessen og/eller hemming av polymerase aktiviteten. Analysen benytter et humant vedlikeholds-gen som en endogen intern kontroll (IC) (humant *Rnase P* gen). Humane vedlikeholds-gener er involvert i grunnleggende celledivisjon og er derfor forventet å eksistere i alle nukleære humane celler og opprettholde relativt konstant genuttryksnivå.

Mål	Kanal	Gen
SARS-CoV-2	475/520	N-gen (N2-regionen)
SARS-CoV-2	630/665	N-gen (N1-regionen)
Endogen intern kontroll (CI)	530/565	humant <i>Rnase P</i> gen

Tabell 1. Mål, kanal og gener

4. Reagenser som følger med

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderer følgende materialer og reagenser, nærmere beskrevet i tabell 2:

Reagens/Materiale	Beskrivelse	Strekkode	Mengde
SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffere, dNTP-er, stabilisatorer og endogen intern kontroll i et stabilisert format	1G folie	2 poser à 12 gjennomiktig rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11 folie	1 pose à 24 gjennomiktig rør

Tabell 2. Reagenser og materialer til rådighet i VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med Cat. N°. VS-NCO324 (444215).

5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™-system.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl).
- Filterspisser.
- Pudderfri engangshansker.

6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter at aluminiums posene med reaksjonsrørene er åpnet, kan disse brukes i opptil 28 dager.

7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forseglar ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.
- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3-extraction kit, eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™-systemet. Unngå til enhver tid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement" pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner, må du ikke brette åpen PCR-kassett (BD MAX™ PCR Cartridge) etter bruk. Forseglingene på PCR-kassett (BD MAX™ PCR Cartridge) er designet for å unngå kontaminering.

- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk eller røyk eller bruk kosmetiske produkter på arbeidsområdet. Vask hendene etter å ha fullført testen.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og / eller biofarlig, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, transport, oppbevaring, håndtering og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for «VIASURE Real Time PCR Detection Kits» ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelig fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.

8. Test prosedyre

8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

The VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er blitt testet på nasopharyngeal-/oropharyngealprøver samlet inn i virustransportmedia (VTM) (Vircell S.L., Spania); nasofaryngealprøver samlet inn i BD™ UVT System-medium, virustransport og conserveringsmedium (Biocomma®), UTM-virustransport (COPAN, Diagnostic Inc.), sterilt transportmedium (Deltalab®), universalt transportmedium (UTM) og IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) fra Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; og spyttprøver samlet inn i Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Andre typer prøver må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal respirasjons- og spyttprøver samles inn og merkes på egnet måte i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene skal transporteres ved 2 til 8 °C i opptil 72 timer, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogent materiale. For langvarig transport (over 72 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤-20 °C eller lavere. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved 2 til 8 °C i opptil 72 timer eller fryses ved -20 °C eller ideelt sett ved -70 °C for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/tining bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

Nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og spyttprøver skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (Specimen collection guidelines), nettstedet <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> og midlertidige retningslinjer for innsamling, håndtering og testing av kliniske prøver for COVID-19 på nettstedet <https://>

www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html) og retningslinjen fra IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018)), og artikkelen 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. Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssett som blir benyttet, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

Når du bruker nasopharyngeal eller oropharyngeal prøver:

1. Pipetter mellom 400 og 750 µl av den nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepenselen samlet inn i virustransportmediumet (VTM) eller i BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media ned i et prøvebufferrør (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) og lukk røret med en membranhetten. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til BD MAX™ System Operation.

Ved bruk av spyttprøver samlet inn i transportmedium:

1. Spyttprøver kan samles inn i virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) med et forhold på 1:3 (spytt:medium). Kjør i virvelblander på høy hastighet i ett minutt. Pipetter 750 µl ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, og lukk røret med en membranhetten. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til BD MAX™ System Operation.

Ved bruk av rene spyttprøver:

1. Kombiner spytt med virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) slik at det endelige forholdet er 1:3 (spytt:medium). Kjør i virvelblander på høy hastighet i ett minutt. Pipetter deretter 750 µl ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, og lukk røret med en membranhetten. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR Protokoll

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet for detaljerte instruksjoner.

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

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermen "Run" (Kjør) på BD MAX™-systemet.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).

- 3) I fanen "Basic Information" (Grunnleggende informasjon), skriv navnet på testen din i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) På nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) På nedtrekksmenyen "Master Mix Format" (Master Mix Format), velg "Type 5" (Type 5).
 - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må du velge "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 950 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren, velger du følgende konfigurasjon under "Custom Barcodes"(Egendefinerte strekkoder):
 - a. Snap-In 2 "Barcode" (Strekkode for klemme 2): 1G (for SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
 - b. Snap-In 3 "Barcode" (Strekkode for klemme 3): 11 (for Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 "Barcode" (Strekkode for klemme 4): et annet VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).
 - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med en ytterligere VIASURE for BD MAX™-test. I så fall må "PCR settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) fylles ut for posisjon 2 (grønn) og posisjon 4 (blå).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 N2 mål	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Endogen IC	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 N1 mål	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabell 3. PCR settings (PCR-innstillinger).

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnsignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

- 10) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du i tillegg følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 4).

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-	

Tabell 4. Parametere for spektral krysstale.

11) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 5).

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid)	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Reverse transcription (Revers transkripsjon)	Vent	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabell 5. PCR-protokoll.

12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

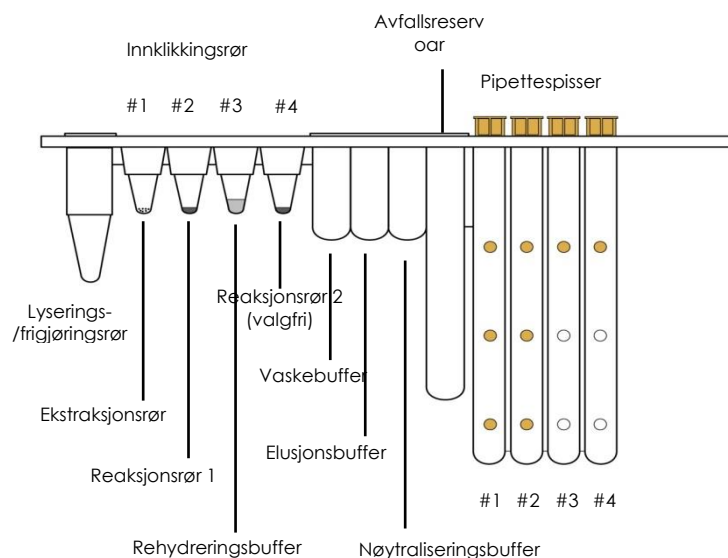
8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- For hver prøve som skal testes, ta ut en separat modulreagensstrimmel fra ekstraksjonssettet (BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit). Bank forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett den i BD MAX™-systemets prøvestativ.
- Ta ut nødvendig antall ekstraksjonsrør (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (hvit folie) fra beskyttelses posen. Klikk ekstraksjonsrøret(ene) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- Fastslå og adskill egnet antall SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (reaksjonsrør) (1G folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.).
 - Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
 - For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele produktet er i bunnen av røret.
 - Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra VIASURE-reaksjonsrør (forskjellig folie) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner

i strimmelen (posisjon 4, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.

- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydrasjon Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (11 folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
 - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

Figur 1. BD MAX™ TNA reagensstrimmel (TNA) fra BD MAX™ ExK™ TNA-3-settet.



8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™-systemets programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test" (Test), velg VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til "Sample Buffer Tube" (prøvebufferrøret) BD MAX™ ExK™ TNA-3 i vinduet "Sample Tube" (prøverør) i "Work List" (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut "Specimen/Patient ID" (prøve-/pasient-ID) og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i "Work List" (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).

- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™-systemet (Stativ A settes på venstre side av BD MAX™-systemet og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser påkrevd antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™-systemet.
- 9) Lukk igjen døren på BD MAX™-systemet.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..."(Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...)".
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermen "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan man analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™-systemet.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 3). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 6.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™-systemet.

Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

SARS-CoV-2 (N2 mål) (475/520)	Endogen Intern kontroll (530/565)	SARS-CoV-2 (N1 mål) (630/665)	Tolkning
+	+/- ¹	+	SARS-CoV-2 N-gen RNA påvist ¹
+ ²	+/- ¹	-	SARS-CoV-2 N-gen RNA påvist ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	SARS-CoV-2 N gen RNA påvist ^{1,2}
-	+ ³	-	SARS-CoV-2 N-gen RNA ikke påvist ³
-	- ³	-	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn ³ .
IND	IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring..

Tabell 6. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted
 -: Ingen amplifikasjon fant sted

1 En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 40. Den endogene interne kontrollen (IC) kan i noen tilfeller gi et forsterket signal. IC deteksjonen er ikke alltid nødvendig fordi et høyt antall kopieringer av målet kan gi foretrukne forsterkninger av målspesifikke nukleinsyrer.

2 Hvis bare et målområde av N-genet forsterkes, bekreft sigdformen av kurven og intensiteten av fluorescensen. Ved en usikker tolkning, avhengig av tilgjengelig materiale, er det i tillegg anbefalt å:

- ekstraher og test på nytt en andel av det samme prøvematerialet (om mulig, øk prøvens volum til 750µl) eller,
- skaff en ny prøve og utfør testen på nytt.

3 Dersom SARS-CoV-2 målet er negativt, må IC vise et forsterkningsignal med Ct under 35. Fordi den endogene interne kontrollen er et vedlikeholds gen som normalt skal finnes i alle humane nukleotide celler i den originale prøven, kan Ct-verdien variere veldig. Ved fravær av signal eller en Ct verdi ≥ 35 i den endogene interne kontrollen, er resultatet å regne som uavklart og testen må utføres på nytt.

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen, bruk av ekstraksjons prosessen av brukeren; for å bekrefte riktig bruk av hvert RT-qPCR steg og revidere parametrene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med syke historikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med Nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og spyttprøver samlet inn i VTM.
- Lyophilized produktene bør være i bunnen av røret, ikke klebe til toppområdet eller foliemembranen for en vellykket utførelse. Bank forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele produktet er i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen er stabilisert, vanligvis i bunnen av røret, ulik den normale (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større og/eller har en annen farge en hvitaktig) endrer ikke det prøvens funksjonalitet.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra luftveisprøver.
- Prøven er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målenivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av SARS-CoV-2, enten prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-RNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- De spesifikke primer- og probekombinasjonene for påvisning av konserverte områder av *N*-genet brukt i VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er beregnet fra den amerikanske CDC analysen for spesifikk påvisning av SARS-CoV-2 ved å forsterke to unike områder av *N* genen. De viser ikke vesentlig homologe kombinasjoner med det humane genom, human mikroflora, SARS-CoV eller andre koronavirus, noe som kan gi forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og deres kombinasjoner, inkludert:
 - Feilaktig innhenting av prøvemateriale, transport, oppbevaring, og/eller håndtering.
 - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert RNA ekstraksjon).
 - Nedbrytning av viralt RNA gjennom transport/ oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
 - Mutasjon eller polymorfisme i primer eller probe bindingområder kan påvirke oppdagelsen av nye eller ukjente SARS-CoV-2 varianter.
 - En virusmengde i prøvematerialet under grensen for deteksjon i analysen.
 - Forekomst av RT-qPCR inhibitorer eller andre typer forstyrrende substanser. Påvirkning fra vaksiner, antivirale legemidler, antibiotika, kjemoterapeutika og immunsuppressive legemidler brukt til å forhindre COVID-19 eller brukt til behandling av infeksjonen, har ikke blitt evaluert.
 - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- Amplifikasjon av et enkelt mål eller selv tilfeldige positive resultat antyder små variasjoner i amplifikasjonsutbytte av målområdet på *N*-genet. Prøver med lite virus kan resultere i *N* enkelt mål amplifikasjon. I tvilstilfeller anbefales det å henvise til et referanselaboratorium for videre testing, hvis klinisk indisert.
- Noen prøver vil ikke vise *Rnase P* amplifikasjonskurver på grunn av få humane celler i den opprinnelige kliniske prøven. Et negativt IC signal utelukker ikke tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2-virus i en klinisk prøve.

- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis levedyktige virus og antyder ikke at virusene er infeksjose eller at de er bakenforliggende årsak til kliniske symptom. Men, en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målets virale sekvens (N-genene).
- Negative resultater utelukker ikke infeksjon med SARS-CoV-2 og bør ikke brukes som det eneste grunnlaget for behandling eller andre bestemmelser relatert til håndtering av pasienter. Optimale prøvetyper og tiden for høyeste virusnivå under infeksjoner forårsaket av SARS-CoV-2 har ikke blitt fastslått. Innsamling av flere prøver (typer og tidspunkter) fra samme pasient kan være nødvendig for å påvise viruset.
- Dersom diagnostiske tester for andre respiratoriske sykdommer er negative og pasientens kliniske symptomer og epidemiologiske informasjon antyder en mulighet for infeksjon med SARS-CoV-2, bør et falskt negativ resultat vurderes og en ny testing av pasienten bør diskuteres.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder en endogen intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

12. Ytelseegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble testet ved bruk av nasofaryngeale prøver og orofaryngeale prøver fra pasienter med mistenkt luftveisinfeksjon. Resultatene var som følger:

	Sted	Prøvetype	Arbeidsflyt	Mål
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	nasofaryngeale prøver	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	nasofaryngeale prøver	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit ved bruk av KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tabell 7. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Ekte positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, sensitivitet, spesifisitetsverdier for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble beregnet i forhold til hver komparatoranalyse som vist i følgende tabeller:

Sted	Komparatoranalyse	Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Spesifisitet
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*

Tabell 8. Ekte positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, sensitivitet, spesifisitet for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Fordi negative prøver ikke ble analysert var det ikke mulig å beregne spesifisitet for testen.

For å evaluere kompatibiliteten av ulike prøvematiser (nasofaryngeal prøve, orofaryngeal prøve og nasofaryngeal/orofaryngeal prøve i VTM fra Vircell) ble det utført en kompatibilitetsstudie. Resultatene fra studien viste at de tre ulike prøvematisene var kompatible med SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med spyttprøver har blitt evaluert. Negative enkle spyttprøver tilsatt en kjent konsentrasjon av frossen, kvantifisert varmedeaktivert kultur av nytt koronavirus 2019; stamme 2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK) ble testet. Evalueringen var utformet for utføring med 30 positive prøver (20 prøver 2 ganger LoD (2xLoD), som tilsvarer 0,53 genom-kopier (GC)/µl og 10 prøver 5 ganger LoD (5xLoD) som tilsvarer 1,32 genom-kopier (GC)/µl og 10 negative prøver. Denne analysen ble utført ved bruk av et 750 µl-prøvevolum for hver tilstand, tilsatt i Sample Buffer Tube (SBT) av TNA-3 Extraction Kit, og den ble kjørt i full prosessmodus (automatisk ekstraksjon og PCR-amplifisering) ved bruk av BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Prosentvis overensstemmelse sammenlignet med forventede resultater for hver enkelt prøve og resultatene er vist i følgende tabell.

Spyttprøve	Overensstemmelse
Positiv prøve (2xLoD)	97.5%
Positiv prøve (5xLoD)	100%
Negativ prøve	100%

Tabell 9. Prosentvis overensstemmelse for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med spyttprøver.

Konklusjonen er at spyttprøver er kompatible med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

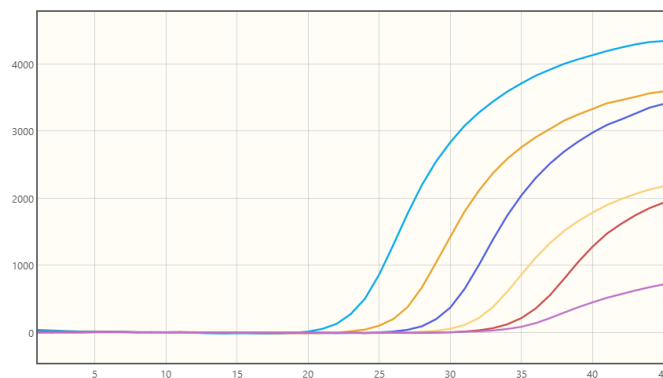
Resultatene viser høyt samsvar med oppdagelse SARS-CoV-2 ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytisk sensitivitet

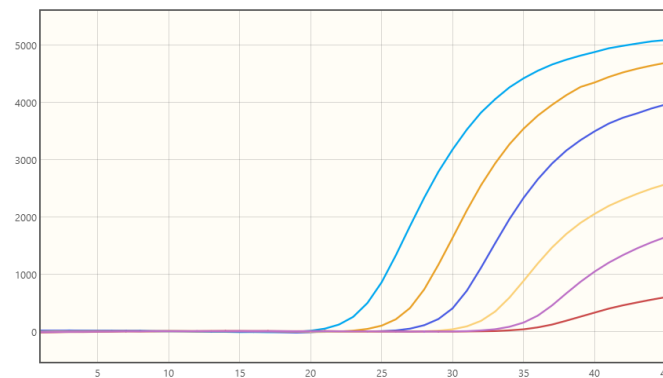
VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrense på ≥ 5 genom-kopier per reaksjon på nasofaryngeale prøver og ≥ 10 genom-kopier per reaksjon på spyttprøver med en positiv rate på ≥ 95 %.

Merk: Deteksjonsgrensen for spyttprøver har blitt beregnet ved bruk av et prøvevolum på 750 μ l (fortynning 1:3 i VTM).

Figur 2. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9.9 \cdot 10^4$ - $9.9 \cdot 10^0$ and $5.0 \cdot 10^0$ genom-kopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™-systemet (475/520 (FAM) kanal).



Figur 3. Fortynningsserie av SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9.9 \cdot 10^4$ - $9.9 \cdot 10^0$ and $5.0 \cdot 10^0$ genom-kopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™-systemet (630/665 (Cy5) kanal).



12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisitet for analyse av SARS-CoV-2 (N1 + N2) ble bekreftet ved testing av et panel bestående av forskjellige mikroorganismer som representerte de vanligste luftveispatogenene. Ingen kryssreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene:

Test av kryssreaktivitet					
Humant adenovirus, type 1–5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influenzavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Humant bocavirus	-	Influenzavirus A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenzavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenzavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Humant metapneumovirus A og B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenzavirus A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenzavirus A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenzavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ikke rifampin-resistent	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A og C	-	Influenzavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 og 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenzavirus A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 og g885652	-
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 og HKU1	-	Influenzavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Humant rhinovirus type C	-
MERS Coronavirus	-	Influenzavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus stamme Frankfurt 1	-	Influenzavirus B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 og 71	-	Influenzavirus B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus 11 og 30	-	Influenzavirus B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 og B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Respiratorisk syncytialt virus (RSV) A og B	-

Tabell 10. Patogen mikroorganismen benyttet som referanse i denne studien.

12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten til VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble evaluert i forhold til RNA fra Human 2019-nCoV-stammen BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV-stammen 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2-stammen 2019Cov/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2-stammen BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, SARS-CoV-2-stammen BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2-stammen BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER og syntetiske RNA-kontroller for fire varianter av SARS-CoV-2-viruset: SARS-CoV-2-isolat Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1, B.1.1.7_710528 og B.1.1.7_601443, med positivt resultat.

Bibliography/Bibliografi

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/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet</p>	 <p>Keep dry Holdes tørr</p>	 <p>Use by Brukes innen</p>	 <p>Manufacturer Produsent</p>	 <p>Batch code (Lot) Partikode (lot)</p>
 <p>Consult instructions for use Les instruksjonene før bruk</p>	 <p>Temperature limitation Temperaturgrenser</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester</p>	 <p>Sample diluent Prøvediluent</p>	 <p>Catalognumber Katalognummer</p>

Trademarks

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

Change Control / Endringskontroll		
Version No. / Versjon n	Changes / Endringer	Date / Dato
00	Original version/ Original versjon.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Tabell over endringskontroll.

Revision: 21st May 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01