

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 / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência para produto a ser utilizado com o 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

Conteúdo

1.	Utilização prevista	19
2.	Introdução e explicação	19
3.	Princípio do procedimento	20
4.	Reagentes fornecidos	21
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	21
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	21
7.	Precauções para o utilizador.....	21
8.	Procedimento de teste	23
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	23
8.2.	Preparação da amostra e extração de ARN.....	23

8.3.	Protocolo PCR	24
9.	Interpretação dos resultados.....	28
10.	Limitações do teste.....	30
11.	Controlo de qualidade	31
12.	Características do teste	31
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	31
12.2.	Sensibilidade analítica.....	33
12.3.	Especificidade analítica.....	33
12.4.	Reactividade analítica.....	34
	Bibliography/Bibliografia	35
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	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
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	✓

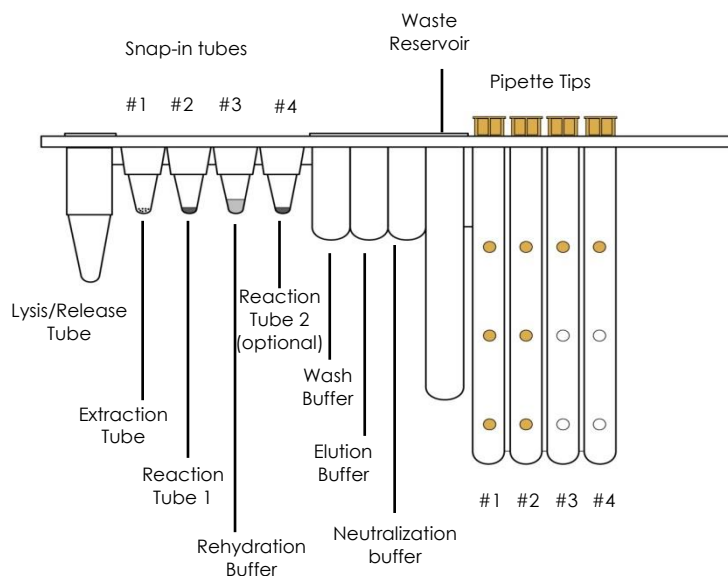
Table 5. PCR protocol.

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 μL (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).

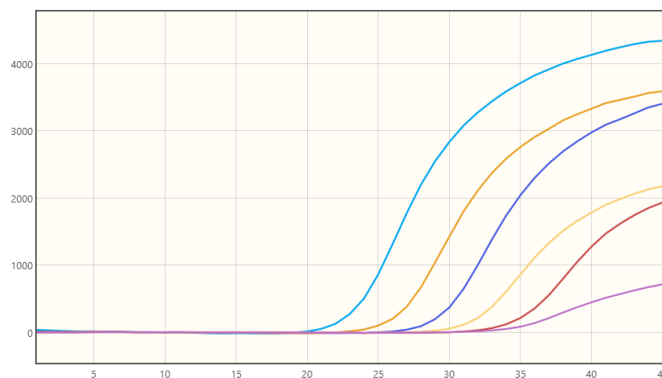
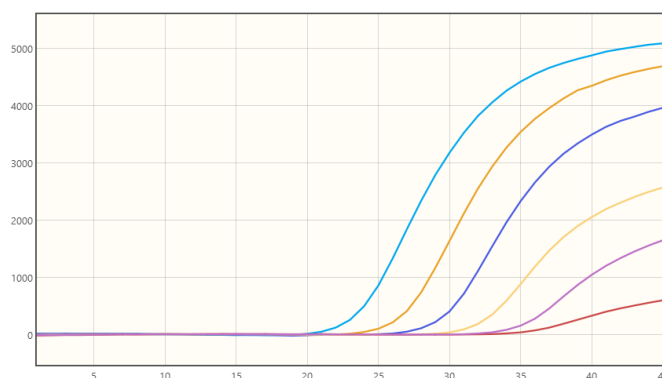


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



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.

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System é um teste automatizado de RT-PCR em tempo real, concebido para a deteção qualitativa de ARN do SARS-CoV-2 em esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e amostras de saliva de indivíduos com suspeita de doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) pelo seu profissional saúde (PS). Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico de COVID-19 em combinação com fatores de risco clínicos e epidemiológicos. O ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para levar a cabo a extração automática de ARN e subsequente RT-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com reagentes universais e descartáveis para o sistema BD MAX™. O ARN é extraído de amostras e o ADN complementar (ADNc) é sintetizado e amplificado utilizando RT-PCR e detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para o SARS-CoV-2.

2. Introdução e explicação

Os coronavírus são vírus de ARN de sentido positivo, não segmentados e encapsulados e pertencem à família *Coronaviridae* [1,2]. Existem seis espécies de coronavírus que se sabe causarem doenças em seres humanos [2]. Quatro vírus (229E, OC43, NL63 e HKU1) causam sintomas de constipação comum e os outros dois (coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus associado a síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV)) são zoonóticos e provocam complicações mais graves [2]. O SARS-CoV e o MERS-CoV causaram mais de 10 000 casos cumulativos nas últimas duas décadas, com taxas de mortalidade de 34% no caso do MERS-CoV e de 10% no caso do SARS-CoV [1,3].

Em dezembro de 2019, algumas pessoas que trabalhavam ou residiam nas redondezas do mercado de peixe de Huanan em Wuhan, Província de Hubei, apresentaram pneumonia de causa desconhecida [2,4]. A análise profunda de sequenciação das amostras respiratórias indicou um novo coronavírus, o qual foi inicialmente designado em 2019 por novo coronavírus (2019-nCoV) e, mais tarde, por SARS-CoV-2 [5].

A transmissão entre humanos do SARS-CoV-2 foi confirmada, mesmo no período de incubação sem sintomas, e o vírus provoca doença respiratória grave, como a causada pelo SARS-CoV [1,6,7,8]. Embora a pneumonia seja a principal doença associada, alguns doentes desenvolveram pneumonia grave, edema pulmonar, síndrome de insuficiência respiratória aguda, ou falência de múltiplos órgãos e morte [1,4]. Os Centros de Prevenção e Controlo de Doenças (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideram que os sintomas do SARS-CoV-2 podem surgir logo ao fim de 2 dias ou apenas ao fim de 14 dias após a exposição, sendo os mais frequentes febre ou arrepios, tosse, fadiga, anorexia, mialgia e dispneia [1,4,6,9]. Dores de garganta, congestão nasal, cefaleias, diarreia, náuseas e vômitos constituem sintomas menos frequentes [1,4]. Também foram relatados sintomas como perda de olfato (anosmia) ou perda de paladar (ageusia) que precedem o início dos sintomas respiratórios [9]. Adultos mais velhos e pessoas com condições médicas preexistentes graves como doença cardíaca ou pulmonar, ou diabetes, parecem apresentar um risco mais elevado de desenvolver complicações mais graves da doença COVID-19 [10].

O diagnóstico do COVID-19 é realizado detetando causas convencionais de pneumonia precoce e por sequenciação de próxima geração ou por métodos de RT-PCR em tempo real [1,11]. Estão atualmente

disponíveis vários ensaios que detetam o SARS-CoV-2, como o do CDC chinês (genes-alvo, *ORF1ab* e *N*), *Charité* – Alemanha (genes-alvo, *RdRP* e *E*) ou o do CDC dos EUA (dois alvos no gene *N*) [12].

O CDC recomenda amostras do trato respiratório superior (amostras de esfregaços nasofaríngeos (NP) e orofaríngeos (OP), esfregaço nasal turbinado médio, esfregaço nasal, lavagem/inspirado nasofaríngeo ou lavagem/inspirado nasal (NW) e espécimes de saliva colhidas sobretudo por um prestador de cuidados de saúde) e/ou amostras do trato respiratório inferior (expectoração, aspirado endotraqueal ou lavagem broncoalveolar em doentes com doença respiratória mais grave) para a identificação do SARS-CoV-2 [11]. Adicionalmente, outras amostras clínicas, como sangue, urina e fezes, poderão ser colhidas para monitorizar a presença do vírus [11,12].

3. Princípio do procedimento

O VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a detecção qualitativa do ARN da SARS-CoV-2 esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e amostras de saliva. A detecção realiza-se através de um formato RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. O ARN-alvo isolado é transcrito gerando ADN complementar por transcriptase reversa, seguindo-se a amplificação de duas regiões conservadas do gene *N* (*N1* e *N2*) utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com fluorescência.

O VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da exonuclease 5' da polimerase do ADN. Durante a amplificação do ADN, esta enzima hidroliza a sonda unida à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade do modelo alvo. Esta fluorescência é monitorizada no sistema BD MAX™.

O VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para realizar o ensaio PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase, transcriptase reversa) num formato estabilizado, bem como um controlo interno endógeno para monitorizar o processo de extração e/ou a inibição da atividade da polimerase. O ensaio utiliza um gene de manutenção (*housekeeping*) humano como controlo interno (CI) endógeno (gene *RNase P* humano). Os genes de manutenção humanos estão envolvidos na manutenção celular básica e, por conseguinte, espera-se que estejam presentes em todas as células humanas nucleadas e mantenham níveis de expressão relativamente constantes.

Alvo	Canal	Gene
SARS-CoV-2	475/520	gene <i>N</i> (região <i>N2</i>)
SARS-CoV-2	630/665	gen <i>N</i> (região <i>N1</i>)
Controlo interno (CI) endógeno	530/565	gene <i>RNase P</i> humano

Tabela 1. Alvo, canal e genes.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Código de barras	Quantidade
SARS-CoV-2 (N1 +N2) reaction tube	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno endógeno em formato estabilizado.	Selo 1G	2 envelopes de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com o N.º de referência VS-NCO324 (444215).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais e equipamento necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.º:442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.º: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e1000 µL).
- Pontas com filtro.
- Luvas não reutilizáveis sem pó.

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contém os tubos de reação, estes podem ser utilizados até 28 dias.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais e técnicos de laboratório ou de saúde, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar reagentes e/ou materiais expirados.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.

- Não utilizar os reagentes se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os reagentes com o fecho zip imediatamente depois de cada utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Em casos em que outros testes de PCR estejam a ser realizados na mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de garantir que o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System o BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, eventuais reagentes adicionais necessários para o ensaio e o sistema BD MAX™ não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) após a utilização. Os selos dos cartuchos de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Usar vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos cosméticos na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras têm de ser tratadas como potencialmente infecciosas e / ou de risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e têm de ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tome as precauções necessárias durante a colheita, o transporte, o armazenamento, a manipulação e a eliminação das amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" não requerem Fichas de Dados de Segurança (Safety Data Sheets) do Material tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.

- Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento de teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos colhidos em Viral Transport Medium (VTM) (Viracell S.L., Spain); esfregaços nasofaríngeos colhidos em meio BD™ UVT System, meio de transporte e conservação de vírus (Biocomma®), UTM Viral Transport (COPAN, Diagnostic Inc.), meio de transporte estéril (Deltalab®), Universal Transport Medium (UTM) e IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) da Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; e amostras de saliva colhidas em Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte dos espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias e de saliva devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas entre 2 °C e 8 °C durante um período máximo de 72 horas, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração (com mais de 72 horas), é recomendado o envio a ≤-20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2 °C a 8 °C por um período máximo de 72 horas ou podem ser congeladas a -20 °C ou, idealmente, a -70 °C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

Os esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e as amostras de saliva têm de ser colhidos, transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e 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>) e as orientações da 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. Preparação da amostra e extração de ARN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

Ao usar amostras nasofaríngeas ou orofaríngeas:

1. Pipetar entre 400 e 750 µl de esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo colhido em meio de transporte viral (VTM) ou em BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media para um tubo de tampão de amostra do sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com BD MAX™ System Operation.

No caso de amostras de saliva colhidas em meio de transporte:

1. As amostras de saliva podem ser colhidas em meio de transporte viral (MTV), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) numa proporção de 1:3 (saliva:meio). Centrifugar a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Pipetar 750 µL da suspensão para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com BD MAX™ System Operation.

No caso de utilizar amostras de saliva puras:

1. Combinar a saliva com o meio de transporte viral (MTV), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) para que a proporção final de saliva:meio seja 1:3. Centrifugar a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Em seguida, pipetar 750 µL da suspensão para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocolo PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™ para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do teste PCR para o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se já tiver criado o teste para o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do sistema BD MAX™, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador de "Basic Information" (Informações básicas), na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolher "Type 5" (Tipo 5).

- b. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE for BD MAX™, em seguida, selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior, em "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
- Snap-In 2 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1G (relativamente ao SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
 - Snap-In 3 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
 - Snap-In 4 "Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 4): outro tubo de reação VIASURE (selo diferente) caso se opte pelo formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
- Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com outro teste VIASURE para o sistema BD MAX™; neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para as posições Snap-In 2 (verde) e Snap-In 4 (azul).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Alvo N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	Cl endógeno	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Alvo N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 3. PCR settings (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).

		False Receiving Channel (Canal receptor falso)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	

Tabela 4. Parâmetros "Spectral cross-talk" (Interação espectral).

11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Reverse transcription (Transcrição reversa)	Retenção	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados))	2-Temperatura	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabela 5. Protocolo PCR.

12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

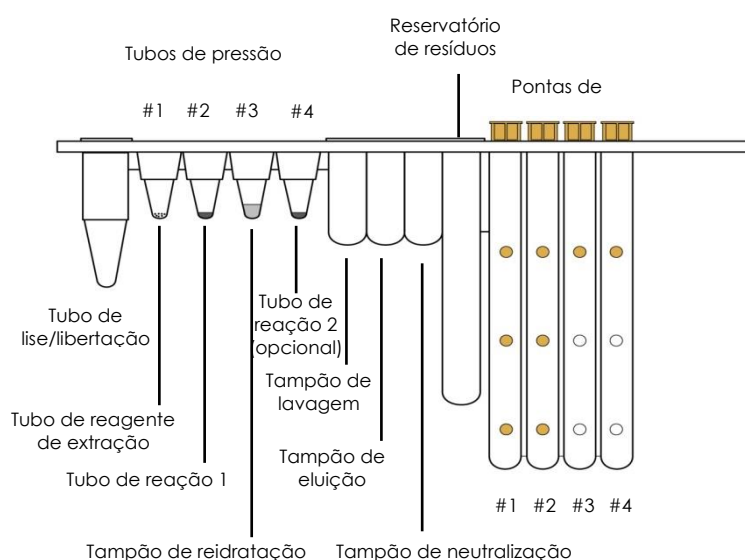
8.3.2. Preparação do suporte para tubos do sistema BD MAX™

- 1) Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual do kit de extração (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit). Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do sistema BD MAX™.
- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- 3) Determinar e separar o número adequado de SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (selo 1G) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - b. Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
 - i. Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM

com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes VIASURE adicionais (selo diferente) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.

- 4) Remover o número necessário de tubos Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1: Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do sistema BD MAX™.
- 2) No menu de lista pendente "Test" (Teste), selecionar VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do "Sample Buffer Tube" (tubo de tampão de amostra) na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através da entrada manual.
- 5) Introduzir "Specimen/Patient ID" (identificação da amostra/doente) e/ou "Accession" (Acesso) do separador "Work List" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra. Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os tubos de tampão de amostra estão corretamente equiparados.

- 6) Colocar o tampão de amostra preparado no(s) suporte(s) para tubos do sistema BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) para tubos no sistema BD MAX™ (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do sistema BD MAX™ e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge(s) no sistema BD MAX™.
- 9) Fechar a porta do sistema BD MAX™.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print ou Export" ((Imprimir o Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do sistema BD MAX™.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do sistema BD MAX™ disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do sistema BD MAX™.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

SARS-CoV-2 (alvo N2) (475/520)	Controlo interno endógeno (530/565)	SARS-CoV-2 (alvo N1) (630/665)	Interpretação
+	+/- ¹	+	ARN do gene N do SARS-CoV-2 detetado ¹
+ ²	+/- ¹	-	ARN do gene N do SARS-CoV-2 detetado ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	ARN do gene N do SARS-CoV-2 detetado ^{1,2}
-	+ ³	-	ARN do gene N do SARS-CoV-2 não detetado ³
-	- ³	-	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ³
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do sistema BD MAX™. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 6. Interpretação.

+: Houve amplificação

-: Não houve amplificação

1 Uma amostra é considerada positiva, se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno (CI) endógeno poderá mostrar ou não um sinal de amplificação. Por vezes, a deteção do CI não é necessária porque um elevado número de cópias do alvo pode causar uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.

2 Se ocorrer a amplificação de apenas um local-alvo do gene N, verificar o formato sigmoide da curva e a intensidade da fluorescência. No caso de uma interpretação duvidosa, consoante o material disponível, também se recomenda:

- a) voltar a extrair e testar outra alíquota do mesmo espécime (se possível, aumentar o volume da amostra para 750 µl) ou,
- b) obter um novo espécime e testar novamente.

3 No caso de locais-alvo negativos para o SARS-CoV-2, o CI deve mostrar um sinal de amplificação com Ct inferior a 35. O valor Ct pode ser muito variável devido ao controlo interno endógeno ser um gene de manutenção humano que deve estar presente em todas as células humanas nucleadas na amostra original. Se houver ausência de sinal ou o valor CT for ≥ 35 do controlo interno endógeno, o resultado é considerado "não resolvido" e é necessário repetir o teste.

No caso de um resultado ambíguo contínuo, recomenda-se rever as instruções de utilização e o processo de extração empregue pelo utilizador, verificar o desempenho de todas as etapas do RT-qPCR e rever os parâmetros, e verificar o formato sigmoide da curva e a intensidade da fluorescência.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado com esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e amostras de saliva colhidos em VTM.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cônico, não homogênea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Pode-se detetar um baixo número de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido a contaminação cruzada por SARS-CoV-2, quer por amostras contendo elevadas concentrações de ARN-alvo quer pela contaminação devida a produtos de PCR de reações anteriores.
- As combinações de oligonucleótido e sonda específicas para deteção de regiões conservadas do gene *N* usadas no VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram concebidas com base no ensaio do CDC dos EUA para deteção específica do SARS-CoV-2 através da amplificação de duas regiões exclusivas do gene *N*. Não apresentam homologies combinadas com o genoma humano, a microflora humana, o SARS-CoV ou outros coronavírus, o que pode resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ARN).
 - Degradação do ARN viral durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas do SARS-CoV-2.
 - Uma carga viral no espécime abaixo do limite de deteção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossuppressores utilizados para prevenir a COVID-19 ou utilizados durante o tratamento da infeção.
 - A não observância das instruções e do procedimento do ensaio.
- A amplificação de um único local-alvo ou até mesmo resultados positivos aleatórios é sugestivo de amplificação ligeiramente diferente do local-alvo do gene *N*. As amostras com baixa carga viral podem resultar em amplificação de um único alvo do gene *N*. Em caso de dúvida, recomenda-se o

encaminhamento para um laboratório de referência para a realização de testes adicionais, se clinicamente indicado.

- Algumas amostras podem não conseguir exibir curvas de amplificação de *RNase P* devido a um número baixo de células humanas na amostra clínica original. Um sinal de CI negativo não exclui a presença de ARN do SARS-CoV-2 num espécime clínico.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de vírus viáveis e não significa que estes vírus são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. Contudo, um resultado positivo é indicador da presença de sequências virais dos alvos (genes *N*).
- Resultados negativos não excluem a infeção pelo SARS-CoV-2 e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. Não foram determinados os tipos de espécimes ideais e o momento em que se alcançam os níveis virais máximos durante as infeções causadas pelo SARS-CoV-2. Pode ser necessária a colheita de vários espécimes (tipos e pontos temporais) do mesmo doente para detetar o vírus.
- Se os testes de diagnóstico de outras doenças respiratórias forem negativos e a apresentação clínica do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infeção pelo SARS-CoV-2, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, com o VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System será necessário repetir o teste. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém um controlo interno (CI) endógeno em cada tubo de reação que confirma o correto desempenho da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado utilizando esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos de doentes com suspeita de infeção respiratória. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	Esfregaços nasofaríngeos	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)	Esfregaços nasofaríngeos	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tabela 7. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparador conforme indicado nas tabelas seguintes:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
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*

Tabela 8. Valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, valores de sensibilidade, especificidade para o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Devido ao facto de não terem sido analisadas amostras negativas, não foi possível realizar o cálculo da especificidade do teste.

De modo a avaliar a compatibilidade de diferentes matrizes de amostra (esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo e esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo em VTM da Vircell), foi realizado um estudo de compatibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que as três diferentes matrizes de amostra eram compatíveis com o tubo de reação SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Foi avaliado o desempenho do VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com amostras de saliva. Foram testadas amostras simples de saliva negativas marcadas com uma concentração conhecida de cultura quantificada congelada, inativada pelo calor, do novo coronavírus 2019, estirpe 2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK). A avaliação foi concebida para ser levada a cabo com 30 amostras positivas (20 amostras 2 vezes o LoD (2xLoD), equivalente a 0,53 cópias de genoma (CG)/μL, e 10 amostras 5 vezes o LoD (5xLoD), equivalente a 1,32 cópias de genoma (CG)/μL, e 10 amostras negativas. Este ensaio foi realizado utilizando um volume de amostra de 750 μL de cada condição, adicionado ao Sample Buffer Tube (SBT) do TNA-3 Extraction Kit e analisado no modo de processamento completo (Extração automática e amplificação PCR) utilizando o BD MAX™ ExK™ TNA-3.

A percentagem de concordância foi calculada em relação ao resultado esperado para cada amostra individual, sendo os resultados apresentados na tabela seguinte.

Amostra de saliva	Concordância
Amostra positiva (2xLoD)	97.5%
Amostra positiva (5xLoD)	100%
Amostra negativa	100%

Tabela 9. Percentagem de concordância do VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com amostras de saliva.

Em conclusão, as amostras de saliva revelaram-se compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Os resultados mostram uma concordância elevada para detetar o SARS-CoV-2 utilizando o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

O VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção ≥ 5 cópias de genoma por reacção em esfregaços nasofaríngeos e ≥ 10 cópias de genoma por reacção em amostras de saliva, com uma taxa positiva $\geq 95\%$.

Nota: O limite de deteção nas amostras de saliva foi calculado utilizando um volume de amostra de 750 μL (diluição 1:3 em MTV).

Figura 2 Diluições em série de um padrão de SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \times 10^4$, $9,9 \times 10^0$ e $5,0 \times 10^0$ cópias de genoma por reacção) executadas no sistema BD MAX™ (canal 475/520 (FAM)).

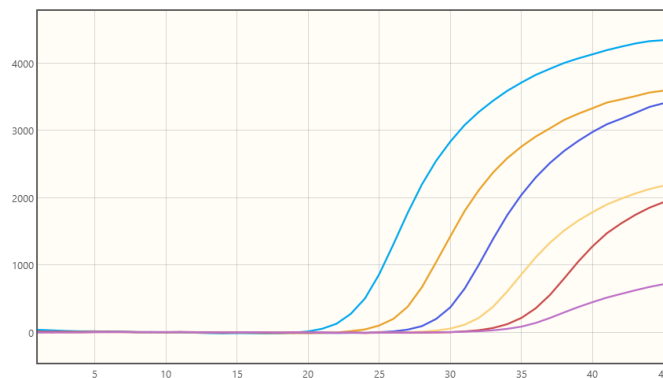
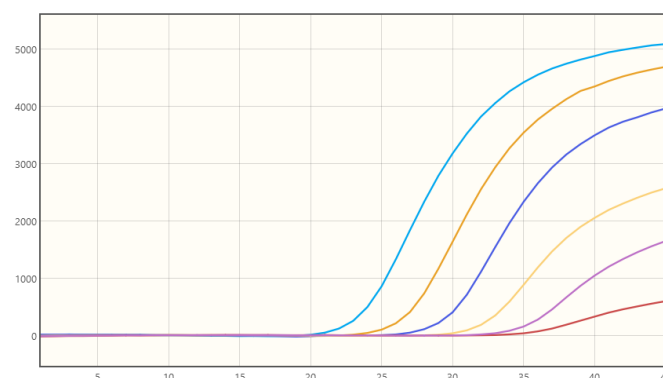


Figura 3 Diluições em série de um padrão de SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \times 10^4$, $9,9 \times 10^0$ e $5,0 \times 10^0$ cópias de genoma por reacção) executadas no sistema BD MAX™ (canal 630/665 (Cy5)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio do SARS-CoV-2 (N1 + N2) foi confirmada testando um painel composto por diferentes microrganismos que representam os agentes patogénicos respiratórios mais comuns. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavírus humano	-	Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Metapneumovírus A e B humano	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> não resistente a rifampicina	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Tipo A1 e g885652	-
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Vírus Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Rinovírus humano tipo C	-
MERS Coronavirus	-	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subespécie <i>aureus</i>	-
Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovírus 68 e 71	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovírus Echovírus 11 e 30	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovírus Cocksackievírus A24, A9 e B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Vírus sincicial respiratório (RSV) A e B	-

Tabela 10. Micro-organismos e agentes patogênicos de referência utilizados neste estudo.

12.4. Reactividade analítica











A reatividade do VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi avaliada comparativamente com ARN da estirpe BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 do 2019-nCoV humano, da estirpe 2019-nCoV/Italy-INMI1 do 2019-nCoV humano, da estirpe 2019nCoV/USA-WA1/2020 do SARS-CoV-2, da estirpe BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER do SARS-CoV-2, da estirpe BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 do SARS-CoV-2, da estirpe BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER do SARS-CoV-2 e controles de ARN sintéticos para quatro variantes do vírus SARS-CoV-2: isolado de SARS-CoV-2 Australia/VIC01/2020, isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, B.1.1.7_710528 e B.1.1.7_601443, revelando resultado 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/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

				
In vitro diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i>	Keep dry Armazenar em local seco	Use by Data de validade	Manufacturer Fabricante	Batch code (Lot) Código do lote
				
Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização	Temperature limitation Limitação de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contém <n> test	Sample diluent Diluyente de amostra	Catalog number Número de referência

Trademarks

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

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º	Changes / Alterações	Date / Data
00	Original version/Versão original.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Tabela de controlo de alterações.

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

