

**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 / Aceste instrucțiuni de utilizare se aplică următoarelor referințe:

PRODUCT / PRODUS	REFERENCE / REFERINȚĂ
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. / Referință pentru produsul care urmează să fie utilizat cu sistemul 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

## Conținut

1.	Utilizarea prevăzută .....	19
2.	Rezumat și explicare .....	19
3.	Principiile procedurii.....	20
4.	Reactivi furnizați .....	20
5.	Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator .....	21
6.	Condiții de transport și depozitare .....	21
7.	Precauții pentru utilizatori.....	21
8.	Procedură de testare .....	22
8.1.	Recoltarea, depozitarea și transportul probelor.....	22
8.2.	Pregătirea probei și extragerea ARN .....	23

---

8.3.	Protocolul PCR.....	24
9.	Interpretarea rezultatelor .....	28
10.	Limitările testului.....	29
11.	Controlul de calitate.....	30
12.	Caracteristici de performanță .....	31
12.1.	Sensibilitate și specificitate clinică.....	31
12.2.	Sensibilitate analitică .....	32
12.3.	Specificitate analitică.....	33
12.4.	Reactivitate analitică .....	34
	Bibliography/Bibliografie .....	35
	Symbols for IVD components and reagents/ Simboluri pentru componentele și reactivii IVD.....	36
	Trademarks.....	36

---

## ENGLISH

---

### 1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from the SARS-CoV-2 in nasopharyngeal/oropharyngeal swab and saliva samples from individuals suspected of Coronavirus disease 2019 (COVID-19) by their healthcare professional (HCP). This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of COVID-19 in combination with clinical and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2.

### 2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to *Coronaviridae* family [1,2]. There are six coronavirus species known to cause human diseases [2]. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications [2]. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV [1,3].

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause [2,4]. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2 [5].

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced [1,6,7,8]. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death [1,4]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever or chills, cough, fatigue, anorexia, myalgia and dyspnea [1,4,6,9]. Less common symptoms are sore throat, nasal congestion, headache, diarrhea, nausea and vomiting [1,4]. Loss of smell (anosmia) or loss of taste (ageusia) preceding the onset of respiratory symptoms has also been reported [9]. Older adults and people who have severe underlying medical conditions like heart or lung disease or diabetes seem to be at higher risk for developing more serious complications from COVID-19 illness [10].

Diagnosis of COVID-19 is performed detecting conventional causes of pneumonia early and detected by next-generation sequencing or real-time RT-PCR methods [1,11]. Several assays that detect the SARS-CoV-2 are currently available, such as China CDC (gene targets, *ORF1ab* and *N*), Charité – Germany (gene targets, *RdRP* and *E*) or US CDC (two targets in *N* gene) [12].

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) and saliva

specimens collected mainly by a healthcare professional) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 [11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [11,12].

### 3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA from SARS-CoV-2 in nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and saliva samples. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase, which is followed by the amplification of two conserved regions of N gene (N1 and N2) using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (IC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

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

Table 1. Target, channel and genes.

### 4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

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

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-NCO324 (444215).

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

## 6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes can be used up to 28 days.

## 7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.

- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

## 8. Test procedure

### 8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal/ oropharyngeal swabs collected in viral transport media (VTM) (Vircell S.L., Spain); nasopharyngeal swabs collected in BD™ UVT System media, Virus transport and preservation medium (Biocomma®), UTM Viral transport (COPAN, Diagnostic Inc.), sterile transport medium (Deltalab®), Universal transport medium (UTM) and IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) from Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; and saliva samples collected in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory and saliva samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend shipping at ≤-20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

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



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

## 8.2. Sample preparation and RNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

1. Pipette between 400 and 750 µL of nasopharyngeal/ oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) or in BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

In case of using saliva samples collected in transport media:

1. Saliva samples may be collected in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT), or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) at a ratio of 1:3 (saliva:media). Vortex for 1 minute at high speed. Pipette 750 µL into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

In case of using neat saliva samples:

1. Combine saliva with Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT), or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) so that the final ratio of saliva:media is 1:3. Vortex for 1 minute at high speed. Then pipette 750 µL into a BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

## 8.3. PCR protocol

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

### 8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.

- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
  - a. Snap-In 2 Barcode: 1G (concerning SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
  - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
  - c. Snap-In 4 Barcode: another VIASURE reaction tube (different foil) if you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
  - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX™ test, "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 2 (green) and Snap-In 4 (blue) positions.

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

Table 3. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation, in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

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

		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

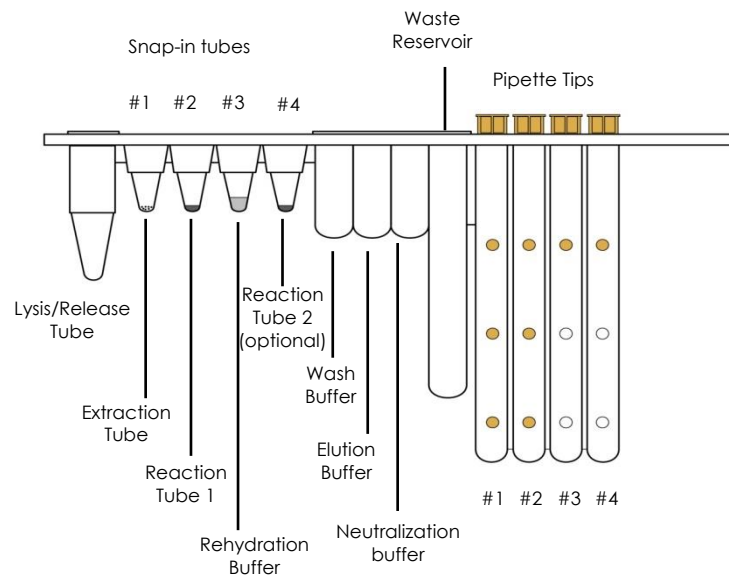
Table 5. PCR protocol.

12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (1G foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
  - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
  - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
    - i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (1I foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
  - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

### 8.3.4. BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot...".
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.

## 9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 3). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 6.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

Results should be read and analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 (N2 target) (475/520)	Endogenous Internal Control (530/565)	SARS-CoV-2 (N1 target) (630/665)	Interpretation
+	+/- <sup>1</sup>	+	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>1</sup></b>
+ <sup>2</sup>	+/- <sup>1</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>1,2</sup></b>
-	+/- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Detected <sup>1,2</sup></b>
-	+ <sup>3</sup>	-	<b>SARS-CoV-2 N gene RNA Not Detected<sup>3</sup></b>
-	- <sup>3</sup>	-	<b>Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.<sup>3</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

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

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

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

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

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

## 10. Limitations of the test

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

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

## 11. Quality control

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

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

## 12.2. Analytical sensitivity

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

Note: The detection limit on saliva samples has been calculated using a sample volume of 750  $\mu\text{L}$  (dilution 1:3 in VTM).

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

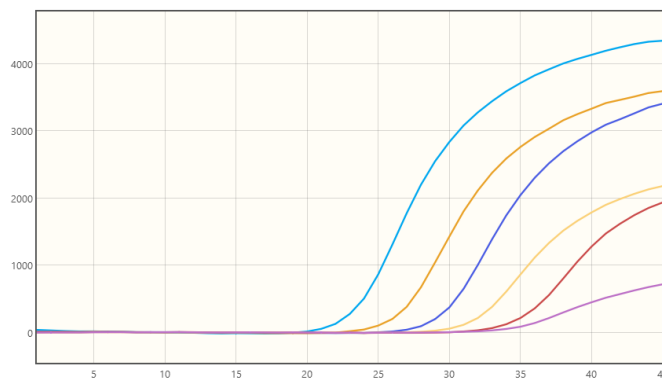
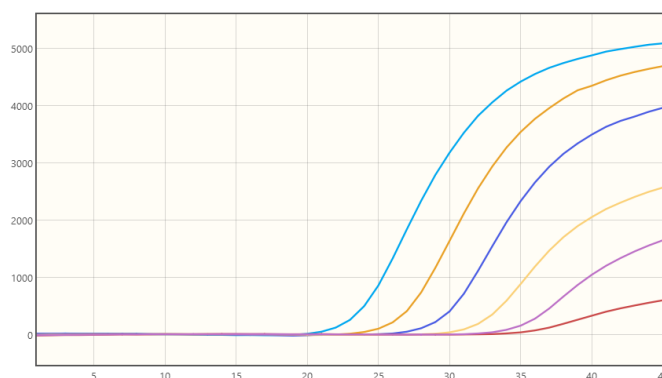


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9.9 \times 10^4$ - $9.9 \times 10^0$  and  $5.0 \times 10^0$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



### 12.3. Analytical specificity

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

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human rhinovirus type C	-
MERS Coronavirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 11 and 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

### 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER and synthetic RNA controls for four variants of the SARS-CoV-2 virus: SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1, B.1.1.7\_710528 and B.1.1.7\_601443, showing positive results.

## ROMÂNĂ

### 1. Utilizarea prevăzută

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System este un test RT-PCR automat, în timp real, destinat pentru detectarea calitativă a ARN de la virusul SARS-CoV-2 în tampon nazofaringian/orofaringian și probe de salivă de la persoane suspectate de boala Coronavirus 2019 (COVID-19) de către furnizorul de asistență medicală (HCP). Acest test este destinat pentru utilizare ca adjuvant în diagnosticul de COVID-19 în combinație cu factori de risc clinic și epidemiologic. Testul utilizează sistemul BD MAX™ pentru extragerea automată a ARN și efectuarea ulterioară în timp real a RT-PCR, folosind reactivii furnizați în combinație cu reactivi universali și cu consumabile pentru sistemul BD MAX™. ARN este extras din specimene, iar ADN-ul complementar (ADNc) este sintetizat și amplificat folosind RT-PCR și detectat cu ajutorul sondelor reporter cu pigment fluorescent, specifice pentru SARS-CoV-2.

### 2. Rezumat și explicare

Coronavirusul este un virus încapsulat, nesegmentat, cu ARN de sens pozitiv, aparținând familiei *Coronaviridae* [1,2]. Sunt cunoscute cinci specii de coronavirus care cauzează boli la om [2]. Patru viruși (229E, OC43, NL63 și HKU1) cauzează simptome comune de răceală iar ceilalți doi (coronavirusul sindromului respirator acut sever (SARS-CoV) și coronavirusul sindromului respirator din orientul Mijlociu (MERS-CoV)) sunt zoonotici și produc complicații mai severe [2]. SARS-CoV și MERS-CoV au cauzat, în mod cumulativ, peste 10.000 de cazuri în ultimele două decenii, cu rate ale mortalității de 34% pentru MERS-CoV și 10% pentru SARS-CoV [1,3].

În decembrie 2019, un număr de oameni care lucrau sau locuiau în zona pieței de fructe de mare Huanan din Wuhan, provincia Hubei, China, au prezentat pneumonie de cauză necunoscută [2,4]. Analiza de secvențiere profundă a probelor respiratorii a indicat un nou coronavirus, care inițial a fost numit noul coronavirus 2019 (2019-nCoV), iar mai apoi SARS-CoV-2 [5].

Transmiterea de la om la om a SARS-CoV-2 a fost confirmată, chiar și în perioada de incubare fără simptome, iar virusul cauzează boală respiratorie severă la fel ca cea produsă de SARS-CoV [1,6,7,8]. Deși pneumonia este principala boală asociată, un număr mic de pacienți au dezvoltat pneumonie severă, edem pulmonar, sindrom de detresă respiratorie acută, insuficiență organică multiplă și deces [1,4]. Centrele de prevenire și control al bolilor (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideră că simptomele de SARS-CoV-2 pot apărea între 2 și 14 zile de la expunere, cele mai frecvente dintre acestea fiind febră, frisoane, tuse, oboseală, anorexie, mialgie și dispnee. Simptome mai puțin frecvente sunt durerea în gât, congestia nazală, cefaleea, diareea, greața și vărsăturile [1,4]. De asemenea, au fost raportate pierderea simțului mirosului (anosmie) sau pierderea simțului gustului (ageuzie) care preced instalarea simptomelor respiratorii [9]. Adulții mai în vârstă și persoanele care au probleme medicale preexistente severe, precum boli cardiace sau pulmonare ori diabet, par să prezinte un risc crescut de a dezvolta complicații mai severe ale bolii cauzate de COVID-19 [10].

Diagnosticul de COVID-19 se efectuează prin detectarea precoce a cauzelor convenționale de pneumonie și detectat prin secvențiere de nouă generație sau metode RT-PCR în timp real [1,11]. În prezent sunt disponibile câteva teste care detectează SARS-CoV-2, precum China CDC (gene țintă, *ORF1ab* și *N*), *Charité* – Germania (gene țintă, *RdRP* și *E*) sau US CDC (două ținte în gena *N*) [12].

CDC recomandă probe din tractul respirator superior (tampoane nasofaringiene (NP) și orofaringiene (OP), tampon nazal din regiunea cornetului mijlociu, tampon nazal, probe din spălătură/aspirat nasofaringian sau spălătură/aspirat nazal (NW) și probe de salivă recoltate în principal de un cadru medical) și/sau probe din tractul respirator inferior (spută, aspirat endotraheal sau lavaj bronhoalveolar la pacienți cu boală respiratorie mai severă) pentru identificarea SARS-CoV-2 [11]. În plus, pot fi recoltate alte probe clinice precum sânge, urină și scaun, pentru a se monitoriza prezența virusului [11,12].

### 3. Principiile procedurii

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System este destinat pentru detectarea calitativă a ARN-ului din SARS-CoV-2 în tampoane nazofaringiene/orofaringiene și probe de salivă. Detectarea se face prin RT-PCR în timp real, în formatul într-o singură etapă, prin care transcripția inversă și amplificarea ulterioară a secvenței țintă specifice au loc în același tub de reacție. Ținta ARN izolată este transcrisă cu generarea de ADN complementar cu ajutorul revers transcriptazei, urmată de amplificarea a două regiuni conservate ale genei *N* (N1 și N2) folosind primeri specifici și sonde cu marcaj fluorescent.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System se bazează pe activitatea de tip 5' exonuclează a ADN polimerazei. În cursul amplificării ADN, această enzimă clivează sonda legată la secvența de ADN complementar, separând molecula blocantă de substanța fluoroforă. Această reacție generează o creștere a semnalului fluorescent care este proporțională cu cantitatea de model țintă. Această fluorescență este măsurată de sistemul BD MAX™.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System conține în fiecare tub toate componentele necesare pentru testul PCR în timp real (primeri/sonde specifice, dNTPs, tampon, polimerază, revers transcriptază) într-un format stabilizat, precum și ca control intern endogen pentru monitorizarea procesului de extracție și/sau inhibarea activității polimerazei. Testul utilizează o genă menajeră umană în calitate de control intern (IC) endogen (genă *RNase P* umană). Genele menajere umane sunt implicate în întreținerea de bază a celulei și, prin urmare, este de așteptat să fie prezente în toate celulele nucleate umane și să mențină un nivel de expresie relativ constant.

Ținta	Canalul	Genă
SARS-CoV-2	475/520	genă <i>N</i> (Regiunea N2)
SARS-CoV-2	630/665	genă <i>N</i> (Regiunea N1)
Control intern (IC) endogen	530/565	genă <i>RNase P</i> umană

Tabelul 1. Ținta, canalul și gene.

### 4. Reactivi furnizați

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include următoarele materiale și următorii reactivi, detaliați/detaliate în Tabelul 2:

Reactiv/Material	Descriere	Cod de bare	Canfitate
SARS-CoV-2 (N1 +N2) reaction tube	Un amestec de enzime, sonde, primeri, tampon, dNTPs, stabilizatori și control intern endogen în format stabilizat	Folie 1G	2 pungi cu câte 12 tuburi transparent
Rehydration Buffer tube	Soluție pentru reconstituirea produsului stabilizat	Folie 11	1 pungă cu 24 tuburi transparent

Tabelul 2. Reactivi și materiale furnizate în VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System cu Cat. nr. VS-NCO324 (444215).

## 5. Reactivi și echipamente care trebuie asigurate de către utilizator

Lista de mai jos include materiale și echipamente care sunt necesare pentru utilizare, însă nu sunt incluse în VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR în timp real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 sau 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipete (cu funcționare precisă între 2 și 1000 µl).
- Vârfuri filtrante.
- Mănuși consumabile, fără pulbere.

## 6. Condiții de transport și depozitare

- Kiturile pot fi transportate și depozitate la 2-40°C până la data de expirare, care este înscrisă pe etichetă.
- După deschiderea pungilor de aluminiu care conțin tuburile de reacție, acestea pot fi utilizate timp de până la 28 de zile.

## 7. Precauții pentru utilizatori

- Acest produs este destinat pentru utilizare numai de către utilizatori profesioniști, cum sunt profesioniști de laborator sau din domeniul sănătății și tehnicieni, instruiți în ceea ce privește tehnicile de biologie moleculară.
- Pentru utilizare în diagnostic *in vitro*.
- Nu utilizați reactivi și/sau materiale expirate.
- Nu utilizați kitul dacă eticheta care sigilează cutia exterioră este ruptă.
- Nu utilizați reactivii dacă cutia de protecție este deschisă sau ruptă la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă pungile de protecție sunt deschise sau rupte la primire.
- Nu utilizați reactivii dacă desiccantul nu este prezent sau este rupt în interiorul pungilor cu reactivi.
- Nu îndepărtați desiccantul din pungile cu reactivi.
- Închideți prompt pungile de protecție care conțin reactivi, cu fermoarul, după fiecare utilizare. Îndepărtați din pungi aerul în exces înainte de sigilare.
- Nu utilizați reactivii dacă folia a fost ruptă sau deteriorată.
- Nu amestecați reactivii din pungi și/sau kituri și/sau loturi diferite.

- Protejați reactivii împotriva umidității. Expunerea prelungită la umiditate poate afecta performanța produsului.
- Feriți componentele de lumină.
- În cazul în care sunt efectuate alte teste PCR în aceeași arie generală a laboratorului, trebuie să aveți grijă ca VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, orice reactivi suplimentari necesari pentru testare și sistemul BD MAX™ să nu fie contaminate. Evitați în permanență contaminarea microbiană și cu ribonuclează (RNază)/dezoxiribonuclează (DNază). Se recomandă utilizarea vârfurilor de pipetare consumabile, lipsite de RNază/DNază, rezistente la aerosoli sau cu dislocuire pozitivă. Utilizați câte un vârf nou pentru fiecare probă. Trebuie să schimbați mănușile înainte de manipularea reactivilor și PCR cartușelor (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Pentru a evita contaminarea mediului cu ampliconi, nu rupeți PCR cartușelor (BD MAX™ PCR Cartridge) după utilizare. Elementele de sigilare ale PCR cartușelor (BD MAX™ PCR Cartridge) sunt concepute să prevină contaminarea.
- Puneți la punct un flux de lucru unidirecțional. Acesta trebuie să înceapă în zona de extracție și să continue în zona de amplificare și zona de detectare. Nu duceți probele, echipamentele și reactivii înapoi în zona în care a fost efectuată etapa precedentă.
- Respectați bunele practici de laborator. Purtați echipament de protecție, utilizați mănuși de unică folosință, ochelari de protecție și mască. Nu mâncați, nu beți, nu fumați și nu aplica produse cosmetice în zona de lucru. Spălați-vă pe mâini după ce terminați testul.
- Probele trebuie tratate ca potențial infecțioase și/sau bio-periculoase, ca fel ca toți reactivii și toate materialele care au fost expuse la probe și trebuie să fie manipulate conform reglementărilor naționale privind siguranța. Luați măsurile de precauție necesare în cursul recoltării, transportul, depozitării, manipulare și eliminării probelor.
- Se recomandă decontaminarea cu regularitate a echipamentului utilizat, în special micropipetele și suprafețele de lucru.
- În conformitate cu Regulamentul (CE) Nr. 1907/2006 (REACH), „VIASURE Real Time PCR Detection Kits” nu au nevoie de fișe tehnice de securitate (Safety Data Sheets) din cauza clasificării lor ca nepericuloase pentru sănătate și mediu, deoarece nu conțin substanțe și/sau amestecuri care îndeplinesc criteriile de clasificare a pericolelor disponibile în Regulamentul (CE) Nr. 1272/2008 (CLP) sau care sunt în concentrații mai mari decât valoarea stabilită în regulamentul menționat pentru declararea lor.
- Consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™ pentru avertizări, precauții și proceduri suplimentare.

## 8. Procedură de testare

### 8.1. Recoltarea, depozitarea și transportul probelor

The VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a fost testat pe tampoane nazofaringiene/orofaringiene recoltate pe mediu de transport viral (VTM) (Vircell S. L., Spania); tampoane nazofaringiene recoltate pe mediu BD™ UVT System, pe mediu de transport și conservare a virusului (Biocomma®), pe mediu de transport viral universal (UTM) (COPAN, Diagnostic Inc.), pe mediu steril de transport (Deltalab®), pe mediu universal de transport (UTM) și pe mediu de conservare viral (VPM) IMPROVIRAL™ de la Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; și probe de salivă colectate pe mediu de transport viral (VTM),

pe mediu de transport viral universal (UVT) BD™ sau pe mediu de conservare viral (VPM) IMPROVIRAL™. Alte tipuri de probe trebuie validate de către utilizator.

Recoltarea, depozitarea și transportul probelor trebuie să se încadreze în condițiile validate de către utilizator. În general, probele respiratorii și de salivă trebuie să fie recoltate și etichetate corespunzător în recipiente curate, cu sau fără mediu de transport (în funcție de tipul probei) și procesate cât mai curând posibil, pentru a se putea garanta calitatea testului. Probele trebuie transportate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 72 de ore, cu respectarea reglementărilor naționale și locale pentru transportul materialelor patogene. În cazul transportului cu durată mare (mai mult de 72 de ore), recomandăm transportul la ≤-20°C sau mai jos. Se recomandă să se utilizeze probe proaspete pentru fiecare test. Probele pot fi depozitate la temperaturi cuprinse între 2 și 8 °C timp de cel mult 72 de ore sau pot fi congelate la -20 °C sau, ideal, la -70 °C, pentru conservare. Trebuie evitate ciclurile repetate de congelare-decongelare, pentru a se preveni degradarea probei și a acizilor nucleici.

Tampoanele nazofaringiene/orofaringiene și probele de salivă trebuie colectate, transportate și depozitate în conformitate cu îndrumările de laborator corespunzătoare. Pentru detalii, consultați linia directoare CDC (Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor din SUA) (Linii directoare de colectare a specimenelor. Site-ul web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> și Liniile directoare interimare pentru colectarea, manipularea și testarea specimenelor clinice pentru COVID-19. Site-ul web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) și linia directoare IDSA (Societatea Americană de Boli Infecțioase) (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018)). Un ghid de utilizare a laboratorului de microbiologie pentru diagnosticarea bolilor infecțioase: actualizare 2018 de către Societatea Americană de Boli Infecțioase și Societatea Americană pentru Microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

## 8.2. Pregătirea probei și extragerea ARN

Efectuați pregătirea probei conform recomandărilor date în instrucțiunile de utilizare ale kitului de extracție folosit, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Rețineți faptul că o parte din celelalte probe ar putea necesita pre-procesare. Procedurile de pregătire a extracției, specifice aplicației, trebuie să fie dezvoltate și validate de către utilizator.

Când utilizați specimene nazofaringiene sau orofaringiene:

1. Pipetați între 400 și 750 μl din tamponul nasofaringian/orofaringian recoltat pe mediul de transport viral (VTM) sau pe mediul BD™ Universal Viral Transport (UVT) System, într-un eșantion de tub tampon (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu BD MAX™ System Operation.

În cazul utilizării probelor de salivă colectate în mediile de transport:

1. Probele de salivă pot fi colectate în Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) sau IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) la un raport de 1:3 (salivă:mediu). Vortexați timp de 1 minut la viteză mare. Pipetați 750 μl într-un tub eșantion de tub tampon (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu BD MAX™ System Operation.

În cazul utilizării probelor de salivă neamestecate:

1. Combinați saliva cu Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) sau IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) astfel încât raportul final salivă:mediu să fie 1:3. Vortexați timp de 1 minut la viteză mare. Apoi pipetați 750 µl într-un eșantion de tub tampon (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) și închideți tubul cu un capac prevăzut cu sept. Asigurați amestecarea completă prin vortexarea probei la viteză mare, timp de 1 minut. Continuați cu BD MAX™ System Operation.

### 8.3. Protocolul PCR

Notă: Pentru instrucțiuni detaliate, vă rugăm să consultați manualul de utilizare al sistemului BD MAX™.

#### 8.3.1. Crearea programului de testare PCR pentru VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Notă: Dacă ați creat deja testul pentru VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, puteți săriți punctul 8.3.1 și să mergeți direct la 8.3.2.

- 1) Deschideți ecranul „Run” (Rulare) al sistemului BD MAX™, selectați fila „Test Editor” (Editor test).
- 2) Dați click pe butonul „Create” (Creare).
- 3) În fila cu „Basic Information” (Informații de bază), în fereastra „Test Name” (Nume test), denumiți testul: adică, VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2).
- 4) În meniul defilant „Extraction Type” (Tip extracție), selectați „ExK TNA-3”.
- 5) În meniul defilant „Master Mix Format” (Format general amestecare), alegeți „Type 5” (Tip 5).
  - a. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX™ suplimentar, apoi selectați „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat general de amestecare dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)).
- 6) În „Sample extraction parameters” (Parametri de extracție probă) selectați „User defined” (Definit de utilizator) și ajustați volumul probei până la 950 µl.
- 7) În „Ct Calculation” (Calcul Ct), selectați „Call Ct at Threshold Crossing” (Apelare Ct la depășirea pragului).
- 8) Dacă rulați versiunea de software 5.00 sau mai recentă, în „Custom Barcodes” (Coduri de bare personalizate) selectați următoarea configurație:
  - a. Snap-In 2 „Barcode” (Cod de bare): 1G (referitor la tub de reacție cu SARS-CoV-2 (N1+ N2) reaction tube).
  - b. Snap-In 3 „Barcode” (Cod de bare): 11 (referitor la tub cu Rehydration Buffer tube).
  - c. Snap-In 4 „Barcode” (Cod de bare): un alt tub de reacție VIASURE (folie diferită) dacă alegeți formatul „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Secțiunea 8.3.1) (MM liofilizat concentrat general de amestecare dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)).



9) În fila „PCR settings” (Setări PCR), introduceți următorii parametri: „Channel Settings” (Setări canal), „Gains” (Câștiguri) și „Threshold” (Prag) (Tabelul 3).

- a. Notă: Produsul poate fi utilizat în combinație cu un test VIASURE pentru BD MAX™ suplimentar, „PCR settings” (setările PCR) și „Test Steps” (etapele de testare) trebuie completate pentru poziția de fixare Snap-In 2 (verde) și poziția de fixare Snap-In 4 (albastru).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Câștig)	Threshold (Prag)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 Țintă N2	80	150	0	40
530/565 (HEX)	IC endogen	80	150	0	35
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	SARS-CoV-2 Țintă N1	80	150	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelul 3. PCR settings (Setări PCR).

Notă: Se recomandă să setați valorile de prag minime listate mai sus pentru fiecare canal la un moment inițial, dar setările finale trebuie determinate de către utilizatorul final în cursul interpretării rezultatelor, pentru a exista siguranța că pragurile se situează în interiorul fazei exponențiale a curbei de fluorescență și deasupra oricărui semnal de fundal. Valoarea prag pentru diferite instrumente poate varia datorită intensităților diferite ale semnalului.

10) În fila „PCR settings” (Setări PCR) introduceți și următorii parametri „Spectral Cross Talk” (Diafonie spectrală) (Tabelul 4).

		False Receiving Channel (Canal fals receptor)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal excitare)	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	-	

Tabelul 4. Parametri „Spectral cross-talk” (diafonie spectrală).

11) În fila „Test Steps” (Etapă test), introduceți protocolul PCR (Tabelul 5).

Step Name (Nume etapă)	Profile Type (Tip profil)	Cycles (Cicluri)	Time (s) ((Temp (s))	Temperature (Temperatură)	Detect (Detectare)
Reverse transcription (Transcripție inversă)	Choque térmico	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Denaturare inițială)	Choque térmico	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturare și annealing/extensie (Colectare date))	2- Temperaturas	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

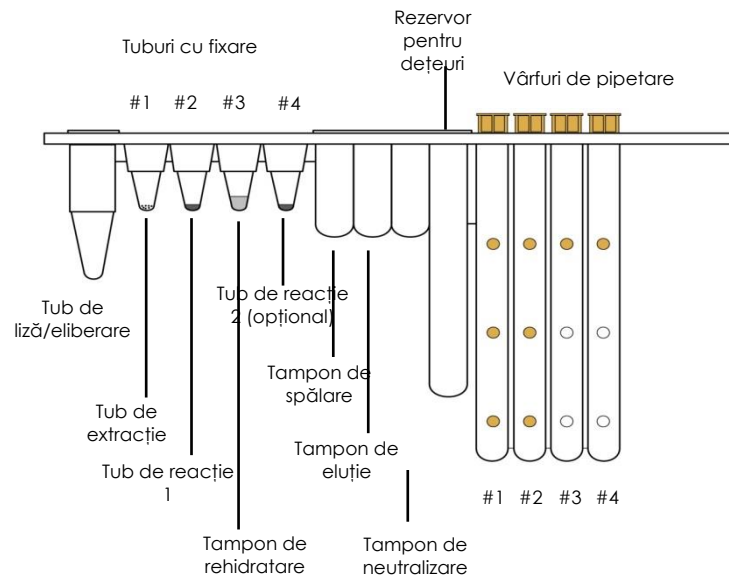
Tabelul 5. Protocol PCR.

12) Dați click pe butonul „Save Test” (Salvare test).

### 8.3.2. Configurarea stativului BD MAX™

- 1) Pentru fiecare probă de testat, scoateți o bandeletă de reactiv unitarizată din kitului de extracție (BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit). Loviți cu blândețe fiecare bandeletă pe o suprafață dură pentru a vă asigura că toate lichidele se află la fundul tuburilor și încărcați pe stativ pentru probe ale sistemului BD MAX™.
- 2) Scoateți numărul necesar de tuburile de extracție (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (folie albă)) din punga de protecție respectivă. Fixați tuburile de extracție (folie albă) în pozițiile corespunzătoare de pe bandeleta TNA (poziția de fixare 1, cod de culoare alb pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
- 3) Determinați și separați numărul adecvat de tuburi de reacție SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tubes (folie 1G) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 2, cod de culoare verde pe stativ. Consultați Figura 1).
  - a. Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
  - b. Pentru a face o rehidratare corectă, vă rugăm să vă asigurați că produsul liofilizat se află la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
    - i. Notă: Dacă alegeți formatul „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (MM liofilizat concentrat de amestecare generală dual cu tampon de rehidratare (Tip 5)) (Secțiunea 8.3.1), determinați și separați numărul adecvat de tuburi de reacție VIASURE suplimentare (folie diferită) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 4, cod de culoare albastru pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți pungile de aluminiu cu sigiliul cu fermoar.
- 4) Scoateți numărul necesar de tuburi Rehydration Buffer tubes (folie 11) și fixați-le în pozițiile lor corespunzătoare de pe bandeletă (poziția de fixare 3, fără cod de culoare pe stativ. Consultați Figura 1). Îndepărtați excesul de aer și închideți punga cu sigiliul cu fermoar.
  - a. Pentru a asigura un transfer corect, vă rugăm să vă asigurați că lichidul este la fundul tubului și că nu este aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că întregul tampon se află la fundul tuburilor.

Figura 1. Tira de reactivi individuale BD MAX™ TNA Reagent (TNA) del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Configurarea instrumentului BD MAX™

- 1) Selectați fila „Work List” (Listă de lucru) din ecranul „Run” (merge) al software-ului sistemului BD MAX™, versiunea v4.50A sau mai recentă.
- 2) În meniul defilant „Test” (Test), selectați VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (dacă nu este deja creat, consultați Secțiunea 8.3.1).
- 3) Selectați numărul de lot adecvat al kitului (înscris pe cutia externă a kitului de extracție utilizat) din meniul defilant (opțional).
- 4) Introduceți numărul de identificare/ cod de bare al „Sample Buffer Tube” (tubului pentru probă cu tampon) BD MAX™ ExK™ TNA-3 în câmpul „Sample tube” (Tub probă) de pe „Work List” (lista de lucru), fie prin scanarea codului de bare, fie prin introducere manuală.
- 5) Completați câmpul „Specimen/Patient ID” (ID probă/pacient) și/sau câmpul „Accession” (Aderare) în „Work List” (lista de lucru) și faceți click pe butonul „Save” (Salvează). Continuați până când toate tuburile pentru probă cu tampon sunt introduse. Asigurați-vă că există o potrivire precisă între ID probă/pacient și tuburile pentru probă cu tampon.
- 6) Puneți tubul pentru probă cu tampon pregătit în stativul/stativale BD MAX™.
- 7) Încărcați stativul/stativale în sistemul BD MAX™ (stativul A este poziționat pe partea stângă a sistemului BD MAX™ iar stativul B pe partea dreaptă).
- 8) Puneți numărul necesar de BD MAX™ PCR Cartridge(s) în sistemul BD MAX™.
- 9) Închideți ușa sistemului BD MAX™.
- 10) Dați click pe „Start Run” (Pornește rulare) pentru a începe procedura.

### 8.3.4. Raportul BD MAX™

- 1) În meniul principal, dați click pe „Results” (Rezultate).
- 2) Fie dați dublu click pe rularea dorită în listă, fie apăsați butonul „view” (vizualizare).
- 3) Dați click pe „Print” (Imprimare) și selectați: „Run Details, Test Details and Plot...” (Detalii rulare, detalii test și compilare...).
- 4) Dați click pe butonul „Print or Export” (Imprimare sau Export) din ecranul „Run Reports” (Rapoarte rulare).

## 9. Interpretarea rezultatelor

Pentru o descriere detaliată a modului de analiză a datelor, consultați manualul de utilizare a sistemului BD MAX™.

Analiza datelor este efectuată de către software-ul BD MAX™, conform instrucțiunilor producătorului. Software-ul BD MAX™ raportează valorile Ct și curbele de amplificare pentru fiecare canal detector al fiecărei probe testate, în felul următor:

- valoarea Ct de 0 indică faptul că nu a existat o valoare Ct calculată de către software cu pragul specificat (consultați Tabelul 3). Curba de amplificare a probei care arată o valoare Ct „0” trebuie să fie verificată manual.
- valoarea Ct de -1 indică faptul că nu a avut loc niciun proces de amplificare.
- orice altă valoare Ct trebuie interpretată în corelație cu curba de amplificare și conform îndrumărilor de interpretare a probei, expuse în Tabelul 6.

Verificați semnalul de control intern pentru a verifica corecta funcționare a amestecului de amplificare. În plus, verificați dacă există o raportare de defecțiune a sistemului BD MAX™.

Rezultatele trebuie să fie citite și analizate folosind următorul tabel:

SARS-CoV-2 (țintă N2) (475/520)	Control intern endogen (530/565)	SARS-CoV-2 (țintă N1) (630/665)	Interpretare
+	+/- <sup>1</sup>	+	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat <sup>1</sup>
+2	+/- <sup>1</sup>	-	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat <sup>1,2</sup>
-	+/- <sup>1</sup>	+2	ARN al genei N SARS-CoV-2 detectat <sup>1,2</sup>
-	+ <sup>3</sup>	-	ARN al genei N SARS-CoV-2 nedetectat <sup>3</sup>
-	_ <sup>3</sup>	-	Rezultat Nerezolvat (UNR) obținut în prezența inhibitorilor din reacția PCR sau când intervine o problemă generală (neraportată printr-un cod de eroare) în legătură cu etapele de procesare a probei și/sau amplificare. <sup>3</sup>
IND	IND	IND	Rezultat test Nedeterminat (IND) Datorat defectării sistemului BD MAX™. Rezultat al testului afișat în caz de defecțare a instrumentului, asociată unui cod de eroare.
INC	INC	INC	Rezultat test Incomplet (INC). Datorat defectării sistemului BD MAX™. Rezultat al testului afișat în caz de eșec la finalizarea rulării.

Tabelul 6. Interpretarea probei.

+: A avut loc amplificarea

-: Nu a avut loc amplificarea

<sup>1</sup> O probă este considerată pozitivă dacă valoarea Ct obținută este mai mică de 40. Controlul intern endogen (IC) poate sau nu să arate un semnal de amplificare. Uneori, detectarea IC nu este necesară deoarece un număr înalt de copiere a țintei poate cauza amplificarea preferențială a acizilor nucleici specifici țintei.

**2** Dacă numai un situs țintă al genei *N* amplifică, verificați forma sigmoidă a curbei și intensitatea fluorescenței. În cazul unui dubiu de interpretare, în funcție de materialul disponibil, se recomandă, de asemenea:

- a) să extrageți și să re-testați un alt alicot din același specimen (dacă este posibil, creșteți volumul probei la 750  $\mu$ l) sau,
- b) obțineți un nou specimen și re-testați.

**3** În caz de situsuri țintă SARS-CoV-2 negative, IC trebuie să prezinte un semnal de amplificare cu Ct mai mic de 35. Valoarea Ct ar putea fi foarte variabilă datorită faptului că Controlul intern endogen este o genă menajeră umană care ar trebui să fie prezentă în toate celulele nucleate umane din proba originală. Dacă se constată o absență a semnalului sau valoarea Ct  $\geq$  35 din Controlul intern endogen, rezultatul este considerat ca „Nerezolvat” și este necesară repetarea testării.

În cazul unui rezultat ambiguu obținut în mod continuu, se recomandă să se revadă instrucțiunile de utilizare, procesul de extracție folosit de către utilizator; să se verifice corecta performanță a fiecărei etape RT-qPCR și să se revizuiască parametrii; și să se verifice forma sigmoidă a curbei și intensitatea fluorescenței.

Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.

## 10. Limitările testului

- Rezultatele testului trebuie să fie evaluate de un profesionist din domeniul medical, ținând seama de antecedentele medicale, simptomele clinice și alte teste cu rol diagnostic.
- Deși testul poate fi utilizat au alte tipuri de probe, acesta a fost validat cu tamponare nasofaringiene/orofaringiene și probele de salivă recoltate în VTM.
- Pentru o bună performanță a testului, produsul liofilizat trebuie să se afle la fundul tubului și să nu fie aderent la partea de sus a tubului sau la folia de sigilare. Loviți cu blândețe fiecare tub de o suprafață dură pentru a vă asigura că toate produsele se află la fundul tuburilor.
- Un aspect al amestecului de reacție în format stabilizat, aflat în mod normal la fundul tubului, care este diferit de cel obișnuit (fără formă conică, neomogen, de dimensiune mai mare/mai mică și cu culoare alta decât alburie) nu afectează funcționalitatea testului.
- Calitatea testului depinde de calitatea probei; trebuie să fie extras acid nucleic de calitate din probele respiratorii.
- Acest test este un test calitativ și nu furnizează valori cantitative, nici nu indică numărul de organisme prezente.
- Pot fi detectate nivele extrem de joase ale țintei, aflate sub limita de detectare, însă rezultatele ar putea să nu fie reproductibile.
- Există o posibilitate de rezultate fals pozitive datorită contaminării încrucișate cu SARS-CoV-2, toate probele conținând concentrații înalte de ARN țintă, sau contaminării datorate produselor PCR provenite de la reacții efectuate anterior.
- Combinațiile specifice de primer și sondă pentru detectarea regiunilor conservate de genă *N* utilizate în VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System au fost proiectate pe baza testului US CDC pentru detectarea specifică a SARS-CoV-2 prin amplificarea a două regiuni unice ale genei *N*. Acestea nu prezintă omologii combinate semnificative cu genomul uman, microflora umană, SARS-CoV sau alți coronavirusi, care ar putea conduce la rezultate fals pozitive predictibile.

- Rezultatele fals negative pot apărea datorită mai multor factori și combinațiilor dintre aceștia, incluzând:
  - Metode necorespunzătoare de recoltare, transport, depozitare și/sau manipulare a probelor.
  - Proceduri necorespunzătoare de procesare (inclusiv de extracție a ARN).
  - Degradarea ARN viral în cursul transportului/depozitării și/sau procesării probei.
  - Mutațiile sau polimorfismele în regiunile de legare ale primerului sau sondei pot afecta detectarea variantelor de SARS-CoV-2 noi sau necunoscute.
  - O încărcare virală a specimenului sub limita de detectare a testului.
  - Prezența inhibitorilor RT-qPCR sau a altor tipuri de substanțe interferente. Nu a fost evaluat impactul vaccinurilor, agenților de terapie antivirală, antibioticelor, chimioterapeuticelor sau medicamentelor imunosupresoare utilizate pentru prevenirea COVID-19 sau utilizate în cursul tratamentului infecției.
  - Nerespectarea instrucțiunilor de utilizare lu a procedurii de testare.
- O amplificare la un situs țintă singular sau chiar rezultate pozitive aleatorii sunt sugestive pentru un randament al amplificării ușor diferit al situsului țintă an genei *N*. Probele cu încărcare virală mică pot conduce la amplificare a țintei *N* unice. În cazul în care există dubii se recomandă trimiterea la un laborator de referință, pentru testări suplimentare dacă este indicat clinic.
- Unele probe ar putea să nu prezinte curbe de amplificare ale *RNase P* datorită numărului redus de celule umane în proba clinică originală. Un semnal IC negativ nu exclude prezența ARN-ului SARS-CoV-2 într-o probă clinică.
- Un rezultat pozitiv al testului nu indică neapărat prezența virusilor viabili și nu înseamnă că acești virusi sunt infecțioși sau sunt agenții cauzatori pentru simptome clinice. Totuși, un rezultat pozitiv indică prezența secvențelor virale țintă (gene *N*).
- Rezultatele negative nu exclud infecția cu SARS-CoV-2 și nu trebuie utilizate ca unică bază pentru deciziile de tratament sau de gestionare a pacientului. Tipurile optime de probe și reperele de timp pentru nivelurile virale maxime în cursul infecției cauzate de SARS-CoV-2 nu au fost determinate. Poate fi necesară recoltarea de probe multiple (ca tipuri și repere de timp) de la același pacient, pentru a detecta virusul.
- Dacă testele diagnostice pentru alte boli respiratorii sunt negative și prezentarea clinică a pacientului, împreună cu informațiile epidemiologice, sugerează că este posibilă infecția cu SARS-CoV-2, trebuie luate în considerare existența unui rezultat fals negativ și retestarea pacientului.
- În cazul în care se obțin rezultate Nerezolvat, Nedeterminat sau Incomplet folosind VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, va fi necesară retestarea. Rezultatele Nerezolvat s-ar putea datora prezenței inhibitorilor în probă sau unei incorecte rehidratări a tubului cu amestec de reacție liofilizat. În cazul unei defecțiuni a instrumentului, vor fi obținute rezultatele Nedeterminat sau Incomplet.

## 11. Controlul de calitate

VIASURE SARS-CoV-2 (*N1* + *N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System conține în fiecare tub de reacție un control intern (IC) endogen, care confirmă aplicarea corectă a tehnicii.

## 12. Caracteristici de performanță

### 12.1. Sensibilitate și specificitate clinică

Performanța clinică a sistemului VIASURE SARS-COV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a fost testată folosind tampoane nazofaringiene și tampoane orofaringiene de la pacienți cu suspiciune de infecție respiratorie. Rezultatele au fost următoarele:

	Situs	Tipul de probă	Fluxul de lucru	Țintă
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	tampoane nazofaringiene	BD MAX™ Exk™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	tampoane nazofaringiene	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit folosind KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tabelul 7. Situs, tipul de probă, fluxul de lucru și țintă.

Valorile adevărat pozitive și negative, valorile fals pozitive și negative, valorile pentru sensibilitate și specificitate pentru VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System au fost calculate în raport cu fiecare test comparativ așa cum se arată în tabelele următoare:

Situs	Test comparativ	Țintă	TP	TN	FP	FN	Sensibilitate	Specificitate
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*

Tabelul 8. Valori adevărat pozitive și negative, valori fals pozitive și negative, sensibilitate, specificitate pentru VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™.

\*Datorită faptului că probele negative nu au fost analizate, calculul specificității testului nu a putut fi efectuat.

Pentru a evalua compatibilitatea diferitelor matrice de probă (tampon nazofaringian, tampon orofaringian și tampon nazofaringian/orofaringian pe VTM de la Vircell), s-a efectuat un studiu de compatibilitate. Rezultatele obținute au prezentat că cele trei matrice diferite de probă au fost compatibile cu tubul de reacție SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Performanța VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System cu probe de salivă a fost evaluată. Probe unice de salivă negative îmbogățite cu o concentrație cunoscută de cultură congelată cuantificată, inactivată la căldură de cultură a Coronavirus de tip nou 2019, Tulpina:2019-nCoV/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK) au fost testate. Evaluarea a fost concepută pentru a fi efectuată cu 30 de probe pozitive (20 de probe cu limita de detecție de 2 ori (2xLoD), echivalentul a 0,53 copii de genom (GC)/μl și 10 probe cu limita

de detecție de 5 ori (5xLoD) echivalentă cu 1,32 copii de genom (GC)/ $\mu$ l) și 10 probe negative. Acest test a fost efectuat folosind un volum de probă de 750  $\mu$ l din fiecare condiție adăugată în tubul pentru probă cu tampon (Sample Buffer Tube) (SBT) al kitului de extracție TNA-3 (TNA-3 Extraction Kit) și a fost rulat în modul proces complet (extracție automată și amplificare PCR) folosind BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Acordul procentual a fost calculat în raport cu rezultatul scontat pentru fiecare probă individuală, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul următor.

Probă de salivă	Acord
Probă pozitivă (2xLoD)	97.5%
Probă pozitivă (5xLoD)	100%
Probă negativă	100%

Tabelul 9. Acordul procentual al VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System cu probe de salivă.

În concluzie, probele de salivă au fost compatibile cu VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Rezultatele indică un nivel înalt de acord pentru detectarea SARS-CoV-2 utilizând VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Sensibilitate analitică

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System are o limită de detecție de  $\geq 5$  copii de genom per reacție pe tampoane nazofaringiene și  $\geq 10$  copii de genom per reacție pe probe de salivă, cu o rată pozitivă de  $\geq 95\%$ .

Notă: Limita de detecție a probelor de salivă a fost calculată utilizând un volum de probă de 750  $\mu$ l (diluție 1:3 în VTM).

Figura 2. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \cdot 10^4$ ,  $9,9 \cdot 10^0$  și  $5,0 \cdot 10^0$  copii de genom per reacție) pe BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

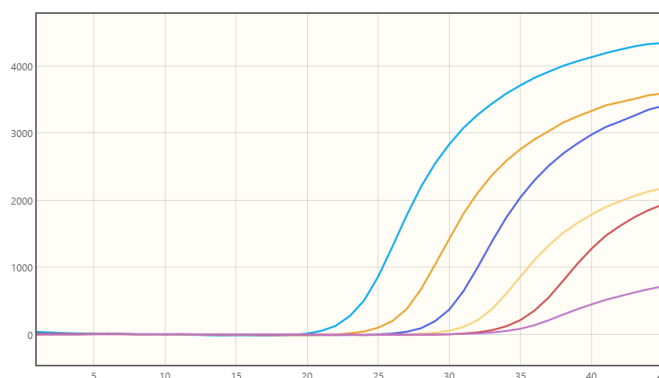
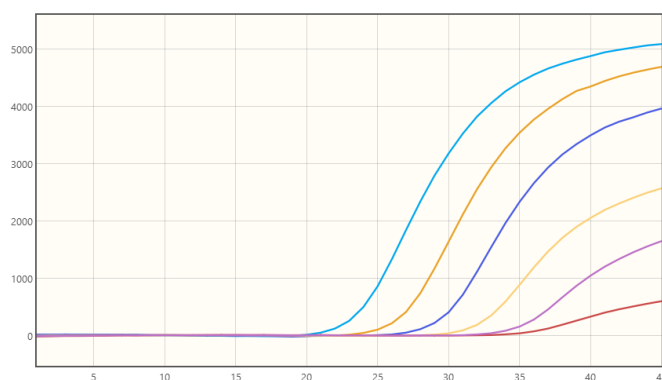




Figura 3. Modelul de rulare pentru seriile de diluție ale SARS-CoV-2 (N1 + N2) ( $9,9 \cdot 10^4$ – $9,9 \cdot 10^0$  și  $5,0 \cdot 10^0$  copii de genom per reacție) pe BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



### 12.3. Specificitate analitică

Specificitatea testului SARS-CoV-2 (N1 + N2) fost confirmată prin testarea unui panel constând din diverse microorganisme reprezentând cei mai frecvenți patogeni din domeniul respirator. Nu a fost detectată nicio reactivitate încrucișată între oricare dintre următoarele microorganisme testate:

Testarea reactivității încrucișate					
Adenovirus uman tipurile 1-5, 8, 15, 31, 40 și 41	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavirus uman	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Metapneumovirus uman A și B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> nerezistent la rifampicină	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipul A și C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virusi paragripali 1, 2, 3 și 4 umani	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> tipul A1 și g885652	-
Coronavirus 229E, OC43, NL63 și HKU1 uman	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Rinovirus uman tip C	-
Coronavirus MERS	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Coronavirus SARS tulpina Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 și 71	-	Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 11 și 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 și B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus respirator sincițial (RSV) A și B	-

Tabelul 10. Microorganisme patogene de referință utilizate în acest studiu.

## 12.4. Reactivitate analitică











Reactivitatea VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a fost evaluată în raport cu ARN de la tulpina 2019-nCoV uman BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, tulpina 2019-nCoV uman 2019-nCoV/Italy-INM11, tulpina SARS-CoV-2 2019nCoV/USA-WA1/2020, tulpina SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, tulpina SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, tulpina SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER, controale de ARN sintetic pentru patru variante de virus SARS-CoV-2: izolat SARS-CoV-2 Australia/VIC01/2020, izolat SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, B.1.1.7\_710528 și B.1.1.7\_601443, prezentând rezultat pozitiv.

## Bibliography/Bibliografie

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/ Simboluri pentru componentele și reactivii IVD

 In vitro diagnostic device Dispozitiv de diagnostic <i>in vitro</i>	 Keep dry A se păstra la loc uscat	 Use by Data de expirare	 Manufacturer Producător	 Batch code (Lot) Cod lot (Lot)
 Consult instructions for use Consultați instrucțiunile de utilizare	 Temperature limitation Limite de temperatură	 Contains sufficient for <n> test Conținut suficient pentru <n> teste	 Sample diluent Diluent probă	 Catalog number Număr catalog

## Trademarks

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

Change Control / Controlul modificărilor		
Version No. / Versiunea nr.	Changes / Modificări	Date / Dată
00	Original version / Versiunea originală.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Tabel de control al modificărilor.

Revision: 21<sup>st</sup> May 2021







# VIASURE



**CerTest Biotec, S.L.**

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

[www.certest.es](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

