

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 / Dessa bruksanvisningar gäller för följande referens:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENS
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. / Referens för produkt som ska användas med BD MAX™-systemet.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user.....	7
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and RNA extraction.....	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	14
11.	Quality control.....	15
12.	Performance characteristics.....	15
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	15
12.2.	Analytical sensitivity	17
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	18

Innehåll

1.	Avsedd användning	19
2.	Sammanfattning och förklaring.....	19
3.	Procedurprincip.....	20
4.	Medföljande reagenser.....	20
5.	Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren.....	21
6.	Transport- och förvaringsförhållanden	21
7.	Försiktighetsåtgärder.....	21
8.	Testa förfarande.....	22
8.1.	Insamling, förvaring och transport av prover	22
8.2.	Provberedning och RNA-extraktion	23

8.3.	PCR-Protokoll	23
9.	Resultatfolkning	27
10.	Testets begränsningar	29
11.	Kvalitetskontroll	30
12.	Prestandaegenskaper	30
12.1.	Klinisk sensitivitet och specificitet	30
12.2.	Analytisk sensitivitet	32
12.3.	Analytisk specificitet	32
12.4.	Analytisk reaktivitet	33
	Bibliography/Bibliografi	34
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser	35
	Trademarks	35

ENGLISH

1. Intended use

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal/ oropharyngeal swabs collected in viral transport media (VTM) (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	✓

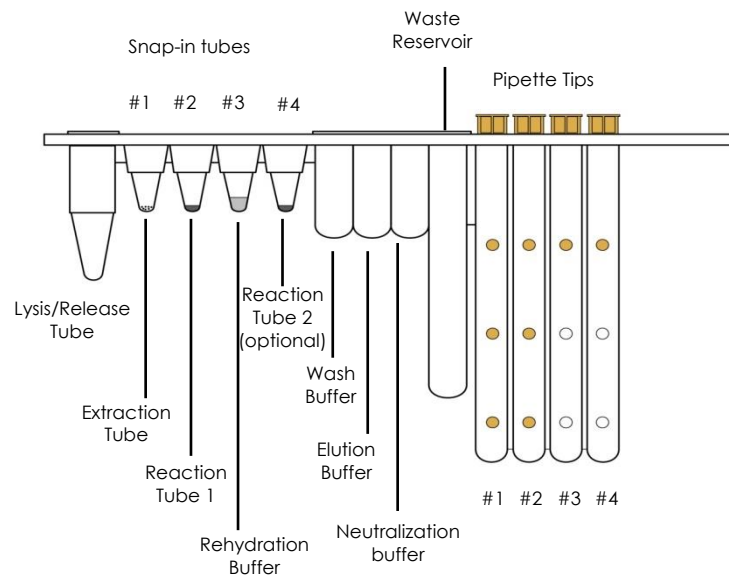
Table 5. PCR protocol.

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

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

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

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

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

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

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

10. Limitations of the test

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

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

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

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

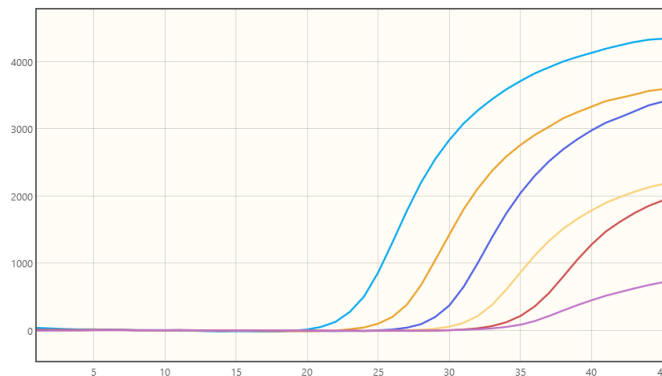
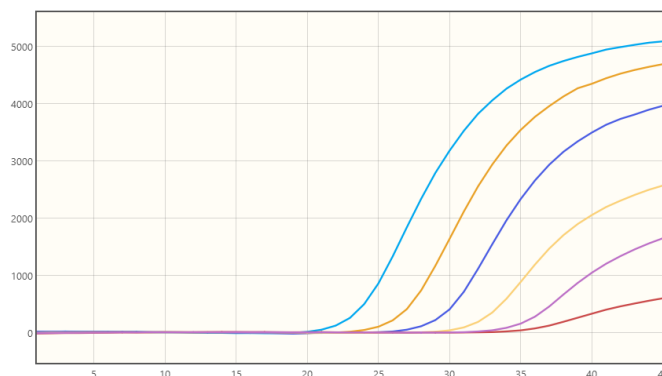


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 (N1 + N2) (9.9×10^4 - 9.9×10^0 and 5.0×10^0 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (630/665 (Cy5) channel).



12.3. Analytical specificity

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

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

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

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

SVENSKA

1. Avsedd användning

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är ett reelltids-RT-PCR-test utformat för kvalitativ detektion av RNA från SARS-CoV-2 i nasofaryngeala/orofaryngeala svabb- och salivprover från individer som enligt sjukvårdspersonal misstänks ha coronavirussjukdom 2019 (COVID-19). Detta test är avsett att användas som ett hjälpmedel vid diagnos av COVID-19 i kombination med kliniska och epidemiologiska riskfaktorer. Analysen använder BD MAX™-systemet för automatiserad extraktion av RNA och efterföljande reelltids-RT-PCR som använder medföljande reagenser kombinerade med universella reagenser och engångsartiklar för BD MAX™-systemet. RNA extraheras från prover, och kompletterande DNA (cDNA) syntetiseras och amplifieras med användning av RT-PCR och detekteras med fluorescerande rapportörfärgprober som är specifika för SARS-CoV-2.

2. Sammanfattning och förklaring

Coronavirus är hölje försedda och icke-segmenterade positiv sense-RNA-virus och tillhör familjen *Coronaviridae* [1,2]. Det finns sex arter av coronavirus som är kända för att orsaka sjukdomar hos människa [2]. Fyra virus (229E, OC43, NL63 och HKU1) orsakar vanliga förkylningssymtom och de andra två (svårt akut respiratoriskt syndrom (SARS-CoV)-coronavirus och respiratoriskt syndrom från Mellanöstern (MERS-CoV)-coronavirus) är zoonotiska och ger svårare komplikationer [2]. SARS-CoV och MERS-CoV har orsakat fler än 10 000 kumulativa fall under de senaste två årtiondena med mortalitetsfrekvenser på 34 % för MERS-CoV och 10 % för SARS-CoV [1,3].

I december 2019 fick vissa personer som arbetade på eller bodde i närheten av Huanans skaldjursmarknad i Wuhan, Hubei-provinsen i Kina, lunginflammation av okänd orsak [2,4]. Djupsekvenseringsanalys av andningsprover påvisade ett nytt coronavirus som först fick namnet nytt 2019-coronavirus (2019-nCoV) och senare SARS-CoV-2 [5].

Överföring mellan människor av SARS-CoV-2 har bekräftats, även under inkubationstiden utan symtom, och viruset orsakar svår respiratorisk sjukdom precis som SARS-CoV [1,6,7,8]. Även om lunginflammationen är den huvudsakliga associerade sjukdomen har ett fåtal patienter utvecklat svår lunginflammation, lungödem, akut respiratoriskt stressyndrom eller flerorgansvikt och dödsfall [1,4]. Den amerikanska myndigheten Centers of Disease Control and Prevention (CDC) tror att symtom på SARS-CoV-2 kan visa sig på så kort tid som 2 dagar eller så lång tid som 14 dagar efter exponering. Vanligaste symtom är feber eller frossa, hosta, trötthet, anorexi, myalgi och dyspné [1,4,6,9]. Mindre vanliga symtom är halsont, nästäppa, huvudvärk, diarré, illamående och kräkningar [1,4]. Förlust av luktsinne (anosmi) eller smaksinne (ageusi) efter debut av symtom i luftvägarna har också rapporterats [9]. Äldre vuxna och personer med allvarlig underliggande sjukdom, t.ex. hjärt- eller lungsjukdom eller diabetes, verkar löpa större risk för att utveckla allvarligare komplikationer av COVID-19 [10].

Diagnos av COVID-19 utförs genom att detektera konventionella orsaker till lunginflammation tidigt och med nästa generations sekvensering eller reelltids-RT-PCR-metoder [1,11]. Flera analyser som detekterar SARS-CoV-2 är tillgängliga för närvarande, t.ex. Kinas CDC (genmålsekvenser, *ORF1ab* och *N*), *Charité* – Tyskland (genmålsekvenser, *RdRP* och *E*) eller USA:s CDC (två målsekvenser i *N*-gen) [12].

CDC rekommenderar prover från övre luftvägarna (nasofaryngeala (NP) och orofaryngeala (OP) svabbprover, svabbprover från mellersta näsmusslan, nasala svabbprover, prover med nasofaryngealt eller nasalt

aspirat/sköljväska (NW) och salivprover som huvudsakligen tas av sjukvårdspersonal) och/eller prover från nedre luftvägarna (sputum, endotrakealt aspirat eller bronkoalveolär sköljväska hos patienter med allvarigare luftvägssjukdom) för identifieringen av SARS-CoV-2 [11]. Dessutom kan andra kliniska prover som blod, urin och feces samlas in för att övervaka förekomsten av virus [11,12].

3. Procedurprincip

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är utformat för kvalitativ detektion av RNA från SARS-CoV-2 i nasofaryngeala/orofaryngeala svabb och salivprover. Detektionen utförs med Realtids-RT-PCR i ett steg där omvänd transkription och efterföljande amplifiering av specifik målsekvens inträffar i samma reaktionsrör. Det isolerade RNA-målet transkriberas och genererar komplementär DNA med hjälp av omvänt transkriptas vilket följs av amplifieringen av en bevarad region av N-genen (N1 och N2) med användning av specifika primrar och fluorescensmärkta prober.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseras på 5'-exonukleasaktivitet av DNA-polymeras. Under DNA-amplifiering klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen vilket separerar quencher-färgen (släckare) från rapportören. Denna reaktion genererar en ökning av fluorescenssignalen som är proportionell mot mängden av målmall. Denna fluorescens mäts på BD MAX™-systemet.

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller i varje rör alla komponenter som är nödvändiga för Realtids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTPs, buffert, polymeras och omvänt transkriptas) i en stabiliserad form samt en endogen intern kontroll för att övervaka extraktionsprocessen och/eller inhiberingen av polymerasaktivitet. Analysen använder en hushållningsgen från människa som en endogen intern kontroll (IC) (human RNase P-gen). Hushållningsgener från människa är involverade i grundläggande cellfunktioner och förväntas därför förekomma i alla kärnförsedda humanceller och bibehålls på relativt konstanta uttrycksnivåer.

Mål	Kanal	Gen
SARS-CoV-2	475/520	N-gen (N2-regionen)
SARS-CoV-2	630/665	N-gen (N1-regionen)
Endogen intern kontroll (IC)	530/565	human RNase P-gen

Tabell 1. Mål, kanal och genen.

4. Medföljande reagenser

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System omfattar följande material och reagenser som anges i tabell 2:

Reagens/Material	Beskrivning	Streckkod	Mängd
SARS-CoV-2 (N1 +N2) reaction tube	En blandning av enzymer, primrar, prober, buffert, dNTP, stabiliserande medel och endogen intern kontroll i stabiliserad form	1G-folie	2 påsar med 12 genomskinlig rör
Rehydration Buffer tube	Lösning för att bereda den stabiliserade produkten	11-folie	1 påse med 24 genomskinlig rör

Tabell 2. Reagens och material som medföljer VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med kat. nr VS-NCO324 (444215).

5. Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren

Följande lista omfattar material och utrustning som krävs för användning men som inte medföljer VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexblandare.
- Mikropipetter (noggrannhet mellan 2 och 1 000 µl).
- Filterspetsar.
- Puderfria engångshandskar.

6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Satserna kan transporteras och förvaras vid 2–40 °C fram till utgångsdatumet som anges på etiketten.
- Efter öppnande kan aluminiumpåsarna som innehåller reaktionsrören användas i upp till 28 dagar.

7. Försiktighetsåtgärder

- Produkten är avsedd att endast användas av yrkesmässiga användare som t.ex. laboratoriepersonal, sjukvårdspersonal och tekniker som har utbildning i molekylärbiologiska tekniker.
- För *in vitro*-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller utgången material.
- Använd inte satsen om etiketten som förseglar den yttre lådan är bruten.
- Använd inte reagenser om den skyddande lådan är öppen eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om de skyddande påsarna är öppna eller förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om torkmedel inte finns eller inte har fungerat i reagenspåsarna.
- Ta inte ut torkmedel från reagenspåsarna.
- Stäng reagensernas skyddande påsar med blixtlås-förseglingen direkt efter varje användning. Avlägsna eventuell luft i påsarna före försegling.
- Använd inte reagenser om folien är bruten eller skadad.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller satser och/eller partier.
- Skydda reagenser från fukt. Längre tids exponering för fukt kan påverka produktprestanda.
- Förvara komponenter borta från ljus.
- I fall då andra PCR-tester utförs i samma allmänna område av laboratoriet måste varsamhet iakttas för att säkerställa att VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, ytterligare reagenser som krävs för testning och BD MAX™-systemet inte är kontaminerade. Undvik alltid kontamination av reagenser från mikroorganismer och ribonukleas (RNas)/deoxyribonukleas (DNas). Användning av sterila, RNas/DNas-fria och aerosolresistenta pipettspetsar eller pipettspetsar av typen positiv förskjutning ("positive displacement"). Använd en ny spets för varje prov. Skyddshandskar måste bytas före hantering av reagenser och PCR kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Bryt inte itu PCR kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge) efter användning för att undvika kontamination av miljön från amplikoner. Tätningarna på PCR kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge) är utformade för att förhindra kontamination.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det bör börja i extraktionsområdet och sedan flytta till amplifierings- och detektionsområdet. Flytta inte prover, utrustning och reagenser tillbaka till området där det föregående steget utfördes.
- Följ god laboratoriesed. Bär skyddskläder, använd engångshandskar, skyddsglasögon och mask. Ät inte, drick inte, rök inte eller används inte kosmetiska produkter i arbetsområdet. Tvätta händerna efter att testet har slutförts.
- Prover måste behandlas som potentiellt smittsamma och / eller biofarligt precis som alla reagenser och material som har exponerats för proverna och de måste hanteras enligt nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder vid insamling, transport, förvaring, hantering och kassering av prover.
- Prover och reagenser måste hanteras i ett biologiskt säkerhetsskåp. Använd personlig skyddsutrustning (PS) som uppfyller aktuella riktlinjer för hantering av potentiellt smittsamma prover. Kassera avfall enligt lokala och nationella bestämmelser.
- Regelbunden dekontaminering av vanligt använd utrustning rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- I enlighet med direktiv (EG) nr 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" kräver inte materialsäkerhetsdatablad (Safety Data Sheets), pga. deras klassificering som ofarliga för hälsa och miljö, eftersom de inte innehåller ämnen och/eller blandningar som uppfyller kriterierna i direktiv (EG) nr 1272/2008 (CLP) eller som förekommer i koncentrationer högre än värdet som etablerats i nämnda direktiv för deras deklaration.
- Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer.

8. Testa förfarande

8.1. Insamling, förvaring och transport av prover

VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats på nasofaryngeala/orofaryngeala svabbar insamlade i virala transportmedia (VTM) (Vircell S.L., Spanien); nasofaryngeala svabbar insamlade i BD™ UVT System-media, virustransport- och konserveringsmedia (Biocomma®), UTM Viral transport (COPAN, Diagnostic Inc.), sterilt transportmedium (Deltalab®), universaltransportmedium (UTM) och IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) från Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd; och salivprover insamlade i Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM). Andra typer av prover måste valideras av användaren.

Insamling, förvaring och transport av prover ska ske enligt villkoren som validerats av användaren. I allmänhet ska luftvägsprover och salivprover samlas in och märkas på lämpligt sätt i rena behållare med eller utan transportmedia (beroende på provtyp) och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Proverna får transporteras vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar enligt lokala och nationella bestämmelser för transporten av patogent material. För långvarig transport (mer än 72 timmar) rekommenderar vi transport vid ≤ -20 °C eller lägre. Det rekommenderas att använda färska prover för testet. Proverna kan förvaras vid 2 till 8 °C i

upp till 72 timmar eller frysta vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller helst vid $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ för bevarande. Upprepade nedfrysningar och upptiningar bör undvikas för att förhindra nedbrytning av provet och nukleinsyror.

De nasofaryngeala/orofaryngeala svabbarna och salivproverna måste samlas in, transporteras och förvaras enligt lämpliga laboratorieriktlinjer. Se CDC guideline för mer information (Specimen collection guidelines. Webbplats <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> och Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Webbplats <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) och IDSA-riktlinje (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: uppdaterad 2018 av Infectious Diseases Society of America och American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Provberedning och RNA-extraktion

Utför provberedning enligt rekommendationerna i bruksanvisningen för extraktionsseten som används, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Observera att vissa andra prover kan kräva förbearbetning. Tillämpningsspecifika procedurer för extraktionsförberedelse ska utvecklas och valideras av användaren.

Vid användning av nasofaryngeala eller oropharyngeal prover:

1. Pipettera mellan 400 och 750 μl nasofaryngealt/orofaryngealt prov insamlat i virustransportmedium (VTM) eller i BD™ Universal Viral Transport (UVT) System-medium i ett provbuffertrör (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.

Vid användning av salivprover insamlade i transportmedia:

1. Salivprover kan samlas in i viralt transportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT), eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) i 1:3 förhållande (saliv:medium). Vortexa i 1 minut på hög hastighet. Pipettera 750 μl i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System.

Om små salivprover används:

1. Kombinera saliv med viralt transportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) så att det slutliga förhållandet saliv:medium är 1:3. Vortexa i 1 minut på hög hastighet. Pipettera sedan 750 μl i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i en minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System.

8.3. PCR-Protokoll

Obs! Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för detaljerade anvisningar.

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

Obs! Om du redan har skapat testet för VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på BD MAX™-systemets skärm "Run" (Kör).
- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Döp testet, dvs. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) i fönstret "Test Name" (Testnamn) på fliken för grundläggande information.
- 4) Välj "ExK TNA-3" i listrutan "Extraction Type" (Extraktionstyp).
- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i listrutan "Master Mix Format" (Masterblandningsform).
 - b. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE för BD MAX™-testet och välj då "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med rehydreringsbuffert (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierad) i "Sample extraction parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till 950 µl.
- 7) Välj "Call Ct at Threshold Crossing" (Hämta Ct vid tröskelvärdesgräns) i "Ct Calculation" (Ct-beräkning).
- 8) Välj följande konfiguration i "Custom Barcodes" (Anpassa streckkoder) om du kör programvaruversion 5.00 eller senare:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Streckkod för rör 2): 1G (gällande SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Streckkod för rör 3): 11 (gällande Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Streckkod för rör 4): en annan VIASURE reaction tube (annan folie) om du väljer formen "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med Rehydration Buffer (typ 5)) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Ange följande parametrar på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar): "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkningar) och "Threshold" (Tröskelvärde) (tabell 3).
 - a. Obs! Produkten kan användas i kombination med ett ytterligare VIASURE för BD MAX™-test och "PCR Settings" (PCR-inställningar) och "Test Steps" (Teststeg) ska slutföras för positionerna för rör Snap-In 2 (grön) och rör Snap-In 4 (blå).

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

Tabell 3. PCR settings (PCR-inställningar).

Obs! Det rekommenderas att ställa in minitröskelvärdena som anges ovan för varje kanal som en startpunkt men de slutliga inställningarna måste fastställas av slutanvändaren under resultattolkningen för att säkerställa att tröskelvärdena faller inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och över eventuell bakgrundssignal. Tröskelvärdet för olika instrument kan variera på grund av olika signalintensiteter.

- 10) Ange även följande parametrar "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar) (tabell 4).

		False Receiving Channel (Falsk mottagarkanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0

Tabell 4. Parametrar för "Spectral cross-talk" (spektral överhörning).

- 11) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 5).

Step Name (Stegnamn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Reverse transcription (Omvänd transkription)	Uppehåll	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Inledande denaturering)	Uppehåll	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering och hybridisering/förlängning (datainsamling))	2-Temperatur	45	10	95°C	-
			61.1	63°C	✓

Tabell 5. PCR-protokoll.

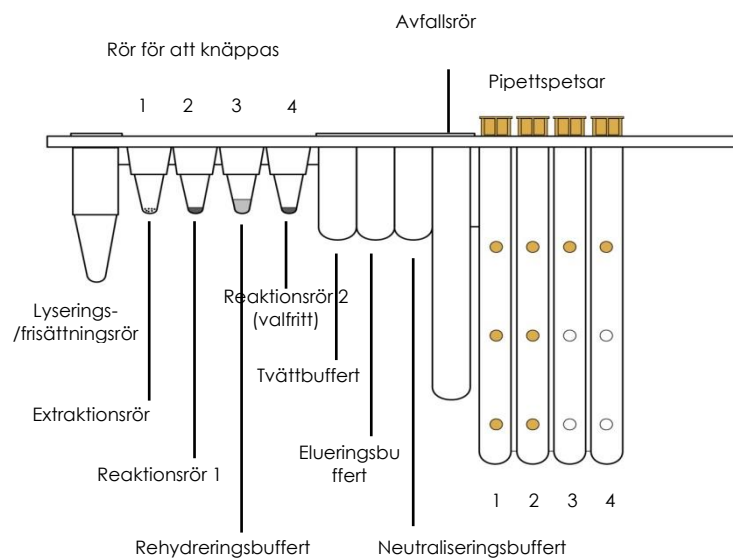
- 12) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).

8.3.2. Installation av BD MAX™-ställ

- 1) För varje prov som ska testas ska du ta ut en sammansatt reagensremsa från extraktionssatsen (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit). Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor finns på rörens botten och ladda den på BD MAX™-systemets provrörställ.

- 2) Ta ut nödvändigt antal extraktionsrör (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (vit folie)) från den skyddande påsen. Knäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner på TNA-remsan (rörposition 1, vit färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
- 3) Bestäm och separera lämpligt antal reaktionsrör för SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (1G-folie) och knäpp fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 2, grön färgkodning på stället, se figur 1).
 - a. Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarerna med blixtlåsförseglingen.
 - b. Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
 - i. Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)) (avsnitt 8.3.1) ska du bestämma och separera lämpligt antal ytterligare VIASURE-reaktionsrör (annan folie) och knäppa fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 4, blå färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarerna med blixtlåsförseglingen.
- 4) Ta ut lämpligt antal Rehydration Buffer tube (1I-folie) och knäpp fast rören på motsvarande positioner på remsan (rörposition 3, färglös kodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
 - b. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all buffert hamnar på botten av röret.

Figur 1. BD MAX™ TNA-reagensremsa (TNA) från BD MAX™ ExK™ TNA-3-sats.



8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrument

- 1) Välj fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Kör) i BD MAX™-systemets programvara v4.50A eller senare.
- 2) I listrutan "Test" (Test) väljer du VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) (se avsnitt 8.3.1 om det inte redan har skapats).
- 3) Välj lämpligt satslotnummer (finns angivet på den använda extraktionssatsens ytterlåda) från listrutan (valfritt).
- 4) Ange identifikationsnummer för "Sample Buffer Tube" (provbuffertröret) BD MAX™ ExK™ TNA-3 i "Sample tube" (fönstret för provrör) i "Work List" (Arbetslista), antingen genom att läsa av streckkoden med en streckkodsläsare eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i fönstret för "Specimen/Patient ID" (prov-/patient-ID) och/eller "Accession" (accession) i "Work List" (Arbetslista) och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla provbuffertrör har angivits. Säkerställ att prov-/patient-ID och provbuffertrör noga överensstämmer.
- 6) Placera det förberedda provbuffertröret i BD MAX™-stället.
- 7) Ladda stället/ställena i BD MAX™-systemet (stall A är positionerat på BD MAX™-systemets vänstra sida och stall B på dess högra sida).
- 8) Placera lämpligt antal BD MAX™ PCR Cartridge i BD MAX™-systemet.
- 9) Stäng BD MAX™-systemets lucka.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att påbörja proceduren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Klicka på knappen "Results" (Resultat) i huvudmenyn.
- 2) Antingen dubbelklicka på din körning i listan eller tryck på knapp "view" (visnings).
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details, Test Details and Plot..." (Körningsinformation, testinformation och kurva ...).
- 4) Klicka på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapport).

9. Resultatolkning

Se användarhandboken för BD MAX™-systemet för en detaljerad beskrivning av dataanalys.

Dataanalys utförs av BD MAX™-programvaran enligt tillverkarens anvisningar. BD MAX™-programvaran rapporterar Ct-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje testat prov på följande sätt:

- Ct-värde på 0 anger att det inte fanns något Ct-värde beräknat av programvaran med det specificerade tröskelvärdet (se tabell 3). Amplifieringskurvan för provet med ett Ct-värde på 0 måste kontrolleras manuellt.
- Ct-värde på -1 anger att ingen amplifieringsprocess har inträffat.
- Ett annat Ct-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och enligt riktlinjerna för provtolkning som finns i tabell 6.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att bekräfta korrekt funktion av amplifieringsblandningen. Kontrollera dessutom att det inte föreligger någon rapport om BD MAX™-systemfel.

Resultat bör avläsas och analyseras med hjälp av följande tabell:

SARS-CoV-2 (N2-mål) (475/520)	Endogen intern kontroll (530/565)	SARS-CoV-2 (N1-mål) (630/665)	Tolkning
+	+/- ¹	+	SARS-CoV-2 N-gen RNA detekterad ¹
+ ²	+/- ¹	-	SARS-CoV-2 N-gen RNA detekterad ^{1,2}
-	+/- ¹	+ ²	SARS-CoV-2 N-gen RNA detekterad ^{1,2}
-	+ ³	-	SARS-CoV-2 N gene RNA inte detekterad ³
-	- ³	-	Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller amplifieringen. ³
IND	IND	IND	Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod.
INC	INC	INC	Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel i BD MAX™-systemet. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras.

Tabell 6. Provtolkning.

+: Amplifiering inträffade
-: Ingen amplifiering inträffade

1 Ett prov anses vara positivt om Ct-värdet som erhålls är lägre än 40. Den endogena interna kontrollen (IC) kan eller kan inte uppvisa en amplifieringssignal. Ibland är IC-detektion inte nödvändig eftersom ett högt antal kopior av målskvansen kan orsaka föredragen amplifiering av målspecifika nukleinsyror.

2 Bekräfta den sigmoidformade formen på kurvan och fluorescensintensiteten om endast ett målställe i N-genen amplifieras. I händelse av en tveksam tolkning beroende på tillgängligt material rekommenderas även att man:

- extraherar och testar igen med en annan alikvot av samma prov (öka provvolymen till 750 µl om möjligt) eller
- tar ett nytt prov och testar igen.

3 IC måste uppvisa en amplifieringssignal med Ct lägre än 35 om SARS-CoV-2-målställena är negativa. Ct-värdet kan variera i mycket hög grad på grund av att den endogena interna kontrollen är en hushållningsgen från människa som bör förekomma i alla kärnförsedda humanceller i det ursprungliga provet. Om det inte förekommer någon signal eller om Ct-värdet är ≥ 35 för den endogena interna kontrollen anses resultatet vara "Unresolved" (Olöst) och omtestning krävs.

Det rekommenderas att konsultera bruksanvisningen, granska extraktionsprocessen som används av användaren, bekräfta korrekt prestanda för varje RT-qPCR-steg och granska parametrarna samt kontrollera den sigmoidiska formen på kurvan och fluorescensintensiteten om ett tvetydigt resultat fortsätter att visas.

Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.

10. Testets begränsningar

- Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om denna analys kan användas med andra typer av prover, har den validerats med nasofaryngealt/orofaryngealt prov och salivproverna taget i VTM.
- Den frystorkade produkten ska finnas i botten av röret för god testprestanda och inte häfta fast vid rörets överdel eller folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
- Testets funktion påverkas inte om reaktionsblandningen i stabiliserad form, vanligtvis i botten av röret, inte ser ut som vanligt (utan konisk form, icke-homogen, mindre/större i storlek och/eller annan färg än vit).
- Testets kvalitet beror på provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra från luftvägsprover måste ske på lämpligt sätt.
- Detta test är kvalitativt och ger inga kvantitativa värden eller anger antalet organismer som förekommer.
- Extremt låga nivåer av mål under detektionsgränsen kan detekteras men resultaten är kanske inte reproducerbara.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av prover som antingen misstänks innehålla SARS-CoV-2 med höga koncentrationer av mål-RNA eller kontamination på grund av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- De specifika primer- och probkombinationerna för detektion av bevarade regioner av *N*-genen som används i VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har utformats baserat på US CDC-analysen för specifik detektion av SARS-CoV-2 genom att amplifiera två unika regioner av *N*-genen. De uppvisar inga signifikanta kombinerade homologier med humangenom, humanmikroflora, SARS-CoV eller andra coronavirus som kan resultera i förutsägbara falskt positiva resultat.
- Falskt negativa resultat kan inträffa på grund av flera faktorer och deras kombinationer, inklusive:
 - Olämplig insamling, transport, förvaring och/eller hantering av prover.
 - Olämpliga processförfaranden (inklusive RNA-extraktion).
 - Nedbrytning av virus-RNA under provtransport/-förvaring och/eller bearbetning.
 - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probbindande regioner kan påverka detektion av nya eller okända SARS-CoV-2-varianter.
 - En virusbelastning i provet under analysens detektionsgräns.
 - Förekomsten av RT-qPCR-inhibitorer eller andra typer av störande ämnen. Inverkan av vacciner, antivirala läkemedel, antibiotika, cellgifter eller immunsänkande läkemedel som används för att förhindra COVID-19 eller som används under behandlingen av infektionen har inte utvärderats.
 - Underlåtenhet att följa bruksanvisningar och analysförfarandet.
- Amplifiering av ett enda målställe eller till och med slumpmässiga positiva resultat antyder ett något annorlunda amplifieringsutbyte för målstället i *N*-genen. Prover med låg virusbelastning kan resultera i amplifiering av ett enda *N*-mål. Det rekommenderas att konsultera ett referenslaboratorium för vidare testning i händelse av tveksamheter om det är kliniskt indicerat.
- Vissa prover uppvisar kanske inte *RNase P*-amplifieringskurvor på grund av lågt humancellantal i det ursprungliga kliniska provet. Ett negativt IC-resultat utesluter inte förekomsten av SARS-CoV-2-RNA i ett kliniskt prov.

- Ett positivt testresultat anger inte nödvändigtvis förekomsten av livskraftiga virus och antyder inte att dessa virus är smittsamma eller orsakar kliniska symtom. Ett positivt resultat anger dock förekomsten av virusmålsekvenser (*N-gener*).
- Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och ska inte användas som den enda grunden för beslut om behandling eller annan patienthantering. Optimala provtyper och tid för virustoppnivåer vid infektioner orsakade av SARS-CoV-2 har inte fastställts. Insamling av flera prover (typer och tidpunkter) från samma patient kan bli nödvändig för att detektera viruset.
- Om diagnostiska tester för andra andningsjukdomar är negativa och patientens kliniska presentation och epidemiologisk information antyder att SARS-CoV-2-infektion är möjlig, ska förekomsten av ett falskt negativt resultat övervägas och en omtestning av patienten bör diskuteras.
- Om resultaten blir olösta, obestämda eller ofullständiga med VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System krävs omtestning. Olösta prover kan vara på grund av förekomsten av inhibitorer i provet eller en inkorrekt rehydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning. Om det föreligger ett instrumentfel kommer obestämda eller ofullständiga resultat att erhållas.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller en endogen intern kontroll (IC) i varje reaktionsrör som bekräftar korrekt prestanda för tekniken.

12. Prestandaegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

Den kliniska prestandan hos VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats med nasofaryngeala och orofaryngeala svabbar från patienter med misstänkt respiratorisk infektion. Resultaten var enligt följande:

	Plats	Provtyp	Arbetsflöde	Mål
1	Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)	nasopharyngeal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	SARS-CoV-2
2	"Servicio de Microbiología" Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	nasopharyngeal swab	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit med KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + BD MAX™ System	SARS-CoV-2

Tabell 7. Plats, provtyp, arbetsflöde och mål.

Sanna positiva och negativa värden, falska positiva och negativa värden, känslighet, specificitet för VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System beräknades i relation till varje jämförelseanalys, enligt vad som visas i följande tabeller:

Site	Jämförelseanalys	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*

Tabell 8. Sanna positiva och negativa värden, falska positiva och negativa värden, känslighet, specificitet, för VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Eftersom negativa prover inte analyserades kunde beräkningen av testets specificitet inte genomföras.

För att utvärdera jämförbarheten mellan olika provmatriser (nasofaryngeal svabb, orofaryngeal svabb och nasofaryngeal/orofaryngeal svabb i VTM från Vircell), har en jämförande studie gjorts. Resultaten visade att tre olika provmatriser var kompatibla med reaktionsröret med SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube.

Prestanda för VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med salivprover utvärderades. Negativa enstaka salivprover spetsade med en känd koncentration kvantifierad, värmeinaktiverad kultur 2019 Novel Coronavirus, Strain:2019-nCov/USA-WA-1/2020 (ATCC-VR-1986HK) testades. Utvärderingen designades att utföras med 30 positiva prover (20 prover 2 gånger LoD (2xLoD), motsvarande 0,53 genomkopior (Gc)/µl, och 10 prover 5 gånger LoD (5xLoD) motsvarande 1,32 genomkopior (GC)/µl) och 10 negativa prover. Analysen gjordes med en 750 µl provvolym för varje tillstånd tillsatt i Sample Buffer Tube (SBT) i TNA-3 Extraction Kit, och det kördes i fullt processläge (automatiserad extraktion och PCR-amplifiering) med BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Överensstämmelseandelen i procent beräknades i relation till det förväntade resultatet för varje enskilt prov, och resultaten visas i följande tabell.

Salivprov	Överensstämmelse
Positivt prov (2xLoD)	97.5%
Positivt prov (5xLoD)	100%
Negativt prov	100%

Tabell 9. Procentandel kompatibilitet mellan VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System och salivprov.

Sammanfattat var salivprover kompatibla med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

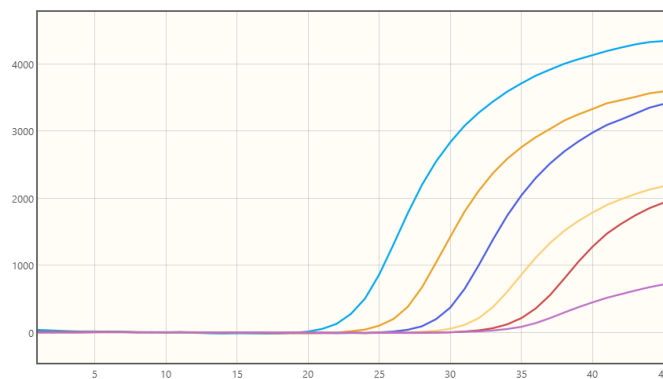
Resultaten uppvisar hög överensstämmelse för att detektera SARS-CoV-2 med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytisk sensitivitet

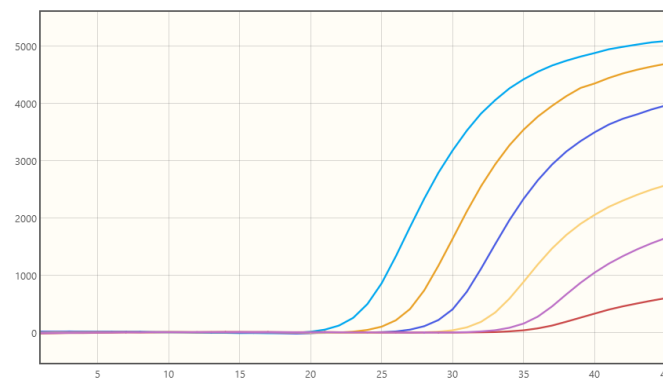
VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en detektionsgräns på ≥ 5 genomkopior per reaktion på nasofaryngeala svabbar och ≥ 10 genomkopior per reaktion på salivprover med en positiv frekvens på ≥ 95 %.

Obs! Detektionsgränsen för salivprover har beräknats med en provvolym på 750 μ l (spädning 1:3 i VTM).

Figur 2. Spädningsserier för SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \cdot 10^4$ – $9,9 \cdot 10^0$ och $5,0 \cdot 10^0$ genomkopior per reaktion) för körning på BD MAX™-systemet (475/520 (FAM)-kanal).



Figur 3. Spädningsserier för SARS-CoV-2 (N1 + N2) ($9,9 \cdot 10^4$ – $9,9 \cdot 10^0$ och $5,0 \cdot 10^0$ genomkopior per reaktion) för körning på BD MAX™-systemet (630/665 (Cy5)-kanal).



12.3. Analytisk specificitet

SARS-CoV-2 (N1 + N2)-analysens specificitet bekräftades genom att testa en panel av olika mikroorganismer som representerar de vanligaste respiratoriska patogenerna. Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av de mikroorganismer som testades:

Test av korsreaktivitet					
Typer av humant adenovirus 1–5, 8, 15, 31, 40 och 41	–	Influensa A/Nya Kaledonien/20/99 (H1N1)-virus	–	<i>Legionella longbeachae</i>	–
Humant bocavirus	–	Influensa A/Kalifornien/7/2009 (H1N1) pdm09-virus	–	<i>Legionella micdadei</i>	–
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	–	Influensa A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09-virus	–	<i>Legionella pneumophila</i>	–
<i>Bordetella holmesii</i>	–	Influensa A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09-virus	–	Humant metapneumovirus A och B	–
<i>Bordetella parapertussis</i>	–	Influensa A/Victoria/210/2009 (H3N2)-virus	–	<i>Moraxella catarrhalis</i>	–
<i>Bordetella pertussis</i>	–	Influensa A/Thüringen/5/2017 (H3N2)-virus	–	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–
<i>Chlamydia caviae</i>	–	Influensa A/Schweiz/9715293/2013 (H3N2)-virus	–	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> som inte är rifampin-resistent	–
<i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A och C	–	Influensa A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-virus	–	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 och 4	–
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	–	Influensa A/södra Australien/55/2014, IVR-175 (H3N2)-virus	–	<i>Pneumocytis jirovecii</i> typ A1 och g885652	–
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 och HKU1	–	Influensa A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)-virus	–	Humant rhinovirus typ C	–
MERS coronavirus	–	Influensa A/Anhui/1/2013 (H7N9)-virus	–	<i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i>	–
SARS coronavirusstam Frankfurt 1	–	Influensa B/Brisbane/60/2008-virus	–	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–
Enterovirus 68 och 71	–	Influensa B/Florida/04/06-virus	–	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	–
Enterovirus Echovirus 11 och 30	–	Influensa B/Phuket/3073/2013-virus	–	<i>Streptococcus pyogenes</i>	–
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 och B3	–	<i>Legionella bozemanii</i>	–	<i>Streptococcus salivarius</i>	–
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	–	<i>Legionella dumoffii</i>	–	Respiratoriskt syncytialvirus (RSV) A och B	–

Tabell 10. Patogena referensmikroorganismer som används i denna studie.

12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten för VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System utvärderades med RNA från human 2019-nCoV-stam BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, human 2019-nCoV-stam 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2-stam 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2-stam BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, SARS-CoV-2-stam BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2-stam BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER, syntetiska RNA-kontroller för fyra varianter av SARS-CoV-2-virus: SARS-CoV-2-isolat Australia/VIC01/2020, SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1, B.1.1.7_710528 och B.1.1.7_601443. Utvärderingen påvisade ett positivt resultat.

Bibliography/Bibliografi

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed January 2021.
4. Chen N. *et al.* Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed January 2021.
7. Lu R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed January 2021.
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed January 2021.
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed January 2021.
12. Yan Y *et al.* Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed January 2021.
14. Chu D.K.W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed January 2021.
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.

18. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. *et al.* Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.
20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>. Accessed January 2021.

Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostik		Keep dry Håll torr		Use by Utgångsdatum		Manufacturer Tillverkare		Batch code (Lot) Satskod (Lot)
	Consult instructions for use Se bruksanvisning		Temperature limitation Temperaturgräns		Contains sufficient for <n> test Innehåller tillräckligt för <n> tester		Sample diluent Provspädningssmede		Catalognumber Katalognummer

Trademarks

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

Change Control / Ändringskontroll		
Version No. / Version nr.	Changes / Ändringar	Date / Datum
00	Original version/ Originalversion.	21/05/2021

Table A 2. Control change table / Kontrolländringstabell.

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