

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



**SARS-CoV-2 Variant
for BD MAX™ System**

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / Diese Gebrauchsanleitung bezieht sich auf folgende Referenz:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENZ
VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444216 / VS-USB124

Table A 1. Reference for product to be used with the BD MAX™ System. / Verweis auf das mit dem BD MAX™ System zu verwendende Produkt.

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	7
4.	Reagents provided	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user.....	8
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users	8
8.	Test procedure	10
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	10
8.2.	Sample preparation and RNA extraction.....	10
8.3.	PCR protocol	11
9.	Result interpretation	14
10.	Limitations of the test	16
11.	Quality control.....	17
12.	Performance characteristics.....	17
12.1.	Clinical sensitivity and specificity.....	17
12.2.	Analytical sensitivity	18
12.3.	Analytical specificity	20
12.4.	Analytical reactivity	21

Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	22
2.	Zusammenfassung und Erläuterung	22
3.	Verfahrensprinzip.....	24
4.	Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	25
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung	25
6.	Transport- und Lagerbedingungen	25
7.	Sicherheitshinweise für Benutzer	26
8.	Testverfahren	27
8.1.	Probenentnahme, -lagerung und Transport	27
8.2.	Probenvorbereitung und RNA-Extraktion.....	28
8.3.	PCR-Protokoll	28

9.	Ergebnisinterpretation.....	32
10.	Grenzen des Tests.....	34
11.	Qualitätskontrolle	35
12.	Testeigenschaften.....	36
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität	36
12.2.	Analytische Empfindlichkeit	36
12.3.	Analytische Spezifität	38
12.4.	Analytische Reaktivität	39
	Bibliography/ Literatur.....	40
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien	41
	Trademarks.....	41

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation in the S gene of SARS-CoV-2, associated to SARS-CoV-2 Alpha (lineage B.1.1.7), Beta (lineage B.1.351) and Gamma (lineage P.1) variants, in nasopharyngeal and oropharyngeal swabs and saliva samples.

The assay is intended to be used with SARS-CoV-2 positive samples or, when the test is performed in conjunction with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) with samples from patients suspected Coronavirus disease 2019 (COVID-19) by their healthcare professional (HCP).

This test is intended to be used as an aid to monitor the prevalence of variants that carry the HV 69/70 deletion, K417N or K417T mutations in the S gene and to assist in control measures. 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 HV 69/70 deletion, K417N or K417T mutations.

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 produce 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].

Since the initial genomic characterization of SARS-CoV-2, the virus has been divided into different genetic groups or clusters (S, L, V, G with GH and GR subgroups). The appearance of mutations is a natural and expected event within the evolution process of the virus. In fact, some specific mutations define the viral genetic groups that are currently circulating globally. The mutations identified to date remain within the expected patterns for a coronavirus. Viruses classified in genetic group G are the most frequent worldwide. Thanks to the genetic sequencing of the pathogen worldwide, it has been possible to establish patterns of dispersal and evolution of the virus.

On December 14, 2020, the United Kingdom declared an increase in the incidence of SARS-CoV-2 in some regions of its country associated with a new variant of the virus with a supposed greater transmission capacity. This variant, called Alpha variant (B.1.1.7) presented 23 different mutations: 13 non-synonymous, including a series of mutations in the spike protein (S), 4 deletions and 6 synonymous. By the end of December, this variant had been detected in 31 countries and territories in 5 of the 6 WHO regions. One of the mutations is the deletion at positions 69-70 in the spike protein. Detection of the HV 69/70 deletion is of great importance since it has been related to immune leakage in immunosuppressed patients and to increased viral infectivity. Another cause for concern in relation to the HV 69/70 deletion is that it affects the sensitivity of virus detection using molecular techniques (RT-PCR) that detects the S gene.

The presence of the HV 69/70 deletion is associated with the Alpha variant, lineage B.1.1.7, however, other variants such as B.1.1.298 (Danish lineage) or B.1.258 also have this deletion.

The Beta (B.1.351) variant was first identified in Nelson Mandela Bay, South Africa, in samples dating back to the beginning of October 2020. The variant also was identified in Zambia in late December 2020, at which time it appeared to be the predominant variant in the country. This variant has multiple mutations in the spike protein, including K417N, E484K, N501Y. It has potential reduction in neutralization by some EUA monoclonal antibody treatments.

The SARS-CoV-2 epidemic in Brazil was dominated by two lineages designated as P.1 and P.2, harboring mutations at the receptor-binding domain of the Spike (S) protein. Lineage P.1 (referred as Gamma) is considered a Variant of Concern (VOC) because it has potential reduction in neutralization by some EUA monoclonal antibody treatments. This Lineage presents multiple mutations in the S protein (including K417T, E484K, N501Y) and its emergence was associated with a second COVID-19 epidemic wave in the Amazonas state. Lineage P.2 is

considered a Variant Under Monitoring (VUM) and only harbors the mutation E484K. The P.2 lineage has been detected as the most prevalent variant in several Amazonas states across the country in late 2020 and early 2021.

The appearance of variants that increase the transmissibility of the virus, its virulence or that escape the action of the neutralizing antibodies generated after natural infection or the vaccine, constitute a first-order public health problem that can have an important impact on control of the pandemic. For this reason, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System allows the detection of HV 69/70 deletion, K417N or K417T mutations associated with Variants of Concern Alpha, Beta and Gamma.

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA with HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation in the S gene of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and 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 a conserved region of S gene for SARS-CoV-2 for HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation using specific primers and fluorescent-labeled probes.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant 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 Variant 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
HV 69/70 deletion	475/520	S gene
K417N mutation	530/565	S gene
K417T mutation	585/630	S gene
Endogenous Internal Control (IC)	630/665	human RNase P gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

Reagent/Material	Description	Color or Barcode	Amount
SARS-CoV-2 Variant reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Green 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 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-USB124 (444216).

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 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- 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.
- Optional: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215)

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, the product 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 care 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 Variant 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.
- If the kit is used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), please refer to the corresponding instructions for use.
- 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 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs and saliva samples, both collected in viral transport medium (VTM) – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD - or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) -Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd and oropharyngeal swabs collected in viral transport medium (VTM) - Vircell. 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 or 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 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE SARS-CoV-2 Variant 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 Variant.
- 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 the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), 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: leave empty (concerning SARS-CoV-2 Variant reaction tube no barcode configuration is needed).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G if used in combination with SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube and 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 the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 4 (blue) position (see the corresponding instructions for use).

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	HV69-70	80	150	0	40
530/565 (HEX)	K417N	80	150	0	40
585/630 (ROX)	K417T	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	IC	80	150	0	35
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 3. PCR settings.

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

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

		False Receiving Channel					
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	1.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	
	630/665	0.0	0.0	5.0	-	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.

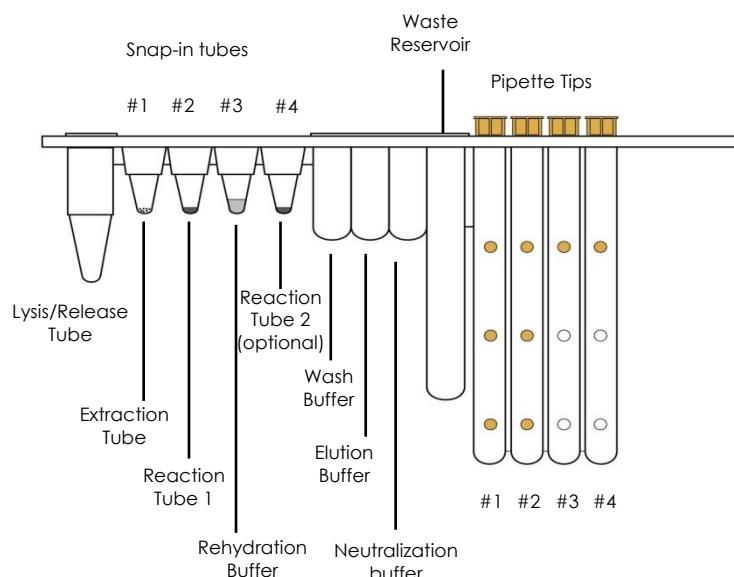
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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.
- 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 Variant reaction tubes (green foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
- Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - 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.
 - 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 SARS-CoV-2 reaction tubes (1G foil in case of VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) 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 (11 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.
- 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

- Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 Variant (if not already created see Section 8.3.1).
- 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.

Analysis of the VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is intended to be performed as a reflex on samples with positive result for SARS-CoV-2 RNA. If used in conjunction with VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System on samples of unknown status for presence of SARS-CoV-2 RNA, please refer to those instructions for use for results interpretation for determination of the SARS-CoV-2 RNA result.

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:

HV 69/70 deletion target (475/520)	K417N mutation target (530/565)	K417T mutation target (585/630)	Endogenous Internal Control (630/665)	Interpretation
+	-	-	+/- ¹	HV 69/70 deletion Detected¹
-	+	-	+/- ¹	K417N mutation Detected¹
-	-	+	+/- ¹	K417T mutation Detected¹
+	+	-	+/- ¹	HV 69/70 deletion and K417N mutation Detected¹
+	-	+	+/- ¹	HV 69/70 deletion and K417T mutation Detected¹
-	+	+	+/- ¹	K417N and K417T mutation Detected¹
+	+	+	+/- ¹	HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation Detected¹
-	-	-	+ ¹	HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation not Detected¹
-	-	-	- ²	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. ²
IND	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	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 In the case of HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation targets 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.

Summary of mutations associated with the following lineages present in the most known Variants of Concern (VOC):

Lineages	WHO label	Mutations in the S gene ¹		
		HV 69/70 deletion	K417N mutation	K417T mutation
B.1.1.7	Alpha	X	-	-
B.1.351	Beta	-	X	-
P.1	Gamma	-	-	X

Table 7. Summary of mutations associated with known Variants of Concern (VOC).

¹<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> (data up to 19 May 2021).

Other variants can present the HV 69/70 deletion and mutations K417T and K417N because they are not specific for the variants mentioned.

Final assignment to a lineage must be done by sequencing.

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/oropharyngeal swabs and saliva samples, all collected in Viral Transport Medium (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 RNA with HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation in the S gene, 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 HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation used in VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, 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 variant.
- 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.
- 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 HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation 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.
- The presence of the HV 69/70 deletion is associated with the Alpha variant (lineage B.1.1.7), K417N mutation with Beta variant (lineage B.1.351) and K417T mutation with Gamma variant (lineage P.1), however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.
- Negative results do not preclude presence of SARS-CoV-2 RNA due to this assay is intended to be used with positive SARS-CoV-2 samples.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 Variant 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 Variant 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 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spain)	nasopharyngeal swab	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HV 69/70 deletion
				Mutation K417T
				Mutation K417N

Table 8. Site, sample type, workflow and target.

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

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit molecular assay + sequencing	HV 69/70 deletion	48	167	0	2	96% (85 – 99)	100% (97 – 100)
		Mutation K417T	50	167	0	0	100% (91 – 100)	100% (97 – 100)
		Mutation K417N	7	209	0	1	88% (46 – 99)	100% (97 – 100)

Table 9. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Result show agreement to detect the HV 69/70 deletion, K417T and K417N SARS-CoV-2 mutations using VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

In order to evaluate the compatibility of different sample matrices (nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab and nasopharyngeal/oropharyngeal swab in Viral Transport Medium (VTM) from Vircell), a compatibility study have been carried out. The obtained results showed that the three different sample matrices were compatible with the VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detection limit (LoD) results with a positive rate of ≥ 95% are as follows:

- a) VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of ≥ 2 genome copies/reaction on nasopharyngeal samples and ≥ 5 genome copies/reaction on saliva samples for HV 69/70 deletion measured using the SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage.
- b) VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of ≥ 5 genome copies/reaction on nasopharyngeal samples and ≥ 5 genome copies/reaction on saliva samples for K417N mutation measured using the SARS-CoV-2 B.1.351 lineage.
- c) VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of ≥ 10 genome copies/reaction on nasopharyngeal samples and ≥ 15 genome copies/reaction on saliva samples for K417T mutation measured using the SARS-CoV-2 P.1 lineage.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (HV 69/70 deletion) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

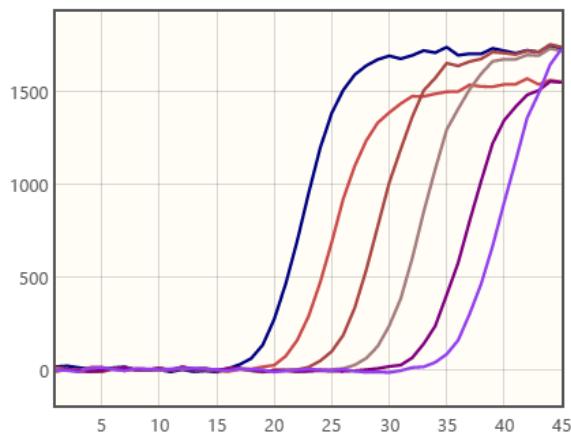


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417N mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

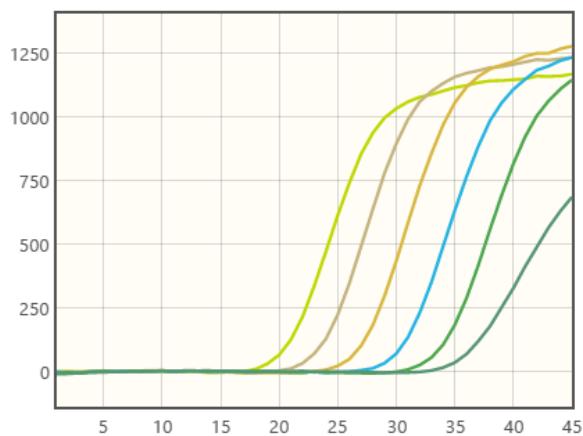
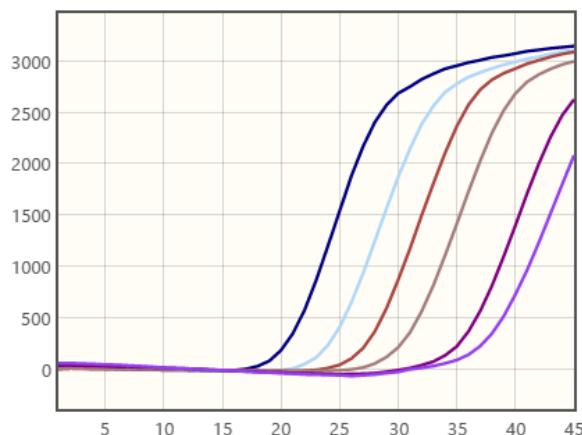


Figure 4. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417T mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 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/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	Mycoplasma pneumoniae
Bocavirus	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Mycobacterium tuberculosis
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 and g885652
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human rhinovirus
Bordetella pertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A/B
Chlamydia caviae	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1*
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	MT007544.1(SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020)*
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)*
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	Legionella bozemani	-	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA/WA1/2020*
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella dumoffii	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*
Enterovirus 68, 71	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Human metapneumovirus A and B	-	Streptococcus pneumoniae
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09 virus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

* Please note that the detection of these SARS-CoV-2 strains is not considered in this assay. This test is designed for the qualitative detection of HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation in the S gene present in SARS-CoV-2 Alpha, Beta and Gamma variants (lineages B.1.1.7, B.1.351 and P.1), among others.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against synthetic RNA controls for two different sequences associated to the Alpha variant (B.1.1.7_710528 UK Variant and B.1.1.7_601443 UK Variant), one sequence associated to the Beta Variant (Control 16, SARS-CoV-2 lineage B.1.351 South Africa/KRISP-ECK005299/2020) and one sequence associated to the Gamma variant (Control 17, SARS-CoV-2 lineage P.1 Japan/Brasilian variant Japan/IC-0564/2021), showing positive results.

DEUTSCH

1. Verwendungszweck

Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist ein automatisierter Echtzeit-RT-PCR-Test für den qualitativen Nachweis der Deletion HV-69/70, der K417N-Mutation und der K417T-Mutation im S-Gen von SARS-CoV-2, die mit SARS-CoV-2 Alpha (Linie B.1.1.7), Beta (Linie B.1.351) und Gamma (Linie P.1) in nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen sowie Speichelproben assoziiert sind.

Der Assay ist für die Verwendung bei SARS-CoV-2-positiven Proben oder, wenn der Test in Verbindung mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) für die Verwendung durch medizinisches Fachpersonal bei Proben von Patienten vorgesehen, bei denen Verdacht auf Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) vorliegt.

Dieser Test soll die Überwachung der Prävalenz von Varianten mit der Deletion HV-69/70, K417N- oder K417T-Mutationen im S-Gen erleichtern und Kontrollmaßnahmen unterstützen. Der Assay nutzt das BD MAX™ System zur automatisierten RNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln für das BD MAX™ System. Dazu wird RNA aus Proben extrahiert und komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese wird mittels RT-PCR amplifiziert, um über spezifische Sonden mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff die Deletion HV-69/70 und K417N- oder K417T-Mutationen nachzuweisen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Coronaviren sind behüllte Positiv-Sense-RNA-Viren mit nicht segmentiertem Genom, die zur Familie der Coronaviridae gehören.[1,2] Bekannt sind sechs Coronavirus-Spezies, die bei Menschen Krankheiten verursachen.[2] Vier Viren (229E, OC43, NL63 und HKU1) verursachen gewöhnliche Erkältungssymptome, die anderen beiden – Coronavirus des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS-CoV) und Coronavirus des Mittleren Ostens (MERS-CoV) – sind zoonotisch und verursachen schwerere Komplikationen.[2] SARS-CoV und MERS-CoV haben in den letzten beiden Jahrzehnten zu mehr als 10.000 kumulativen Fällen geführt, wobei die Mortalitätsrate bei einer MERS-CoV-Infektion 34 % und bei einer SARS-CoV-Infektion 10 % betrug.[1,3].

Im Dezember 2019 trat bei einigen Menschen, die auf dem Huanan-Meeresfrüchtemarkt in Wuhan in der chinesischen Provinz Hubei arbeiteten oder in dessen Umgebung wohnten, eine Lungenentzündung unbekannter Ursache auf [2,4]. Die Analyse der Atemwegsproben von Erkrankten durch Tiefensequenzierung wies auf ein neuartiges Coronavirus hin, das zunächst als „2019 neuartiges Coronavirus (2019-nCoV“ und später als „SARS-CoV-2“ bezeichnet wurde.[5]

Die Mensch-zu-Mensch-Übertragung von SARS-CoV-2 – selbst während der symptomlosen Inkubationszeit – wurde bestätigt. Wie SARS-CoV verursacht auch SARS-CoV-2 schwere Atemwegserkrankungen.[1,6,7,8] Vor allem die Lungenentzündung ist mit dem Virus assoziiert, bei einigen Patienten kam es jedoch zu schwerer Pneumonie, Lungenödem, akutem Atemnotsyndrom oder auch multiplem Organversagen und Tod.[1,4] In der US-Behörde CDC (Centers of Disease Control and Prevention) geht man davon aus, dass SARS-CoV-2-Symptome innerhalb von 2 bis 14 Tagen nach der Exposition auftreten können; am häufigsten sind dabei Fieber oder Schüttelfrost, Husten,

Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Muskelschmerzen und Atemnot.[1,4,6,9] Weniger häufige Symptome sind Halsschmerzen, verstopfte Nase, Kopfschmerzen, Durchfall, Übelkeit und Erbrechen.[1,4] Ein Verlust des Geruchs-(Anosmie) oder Geschmackssinns (Ageusie), der dem Einsetzen der Atemwegssymptome vorausgeht, wurde ebenfalls beobachtet [9]. Bei älteren Erwachsenen oder Personen mit schweren Vorerkrankungen wie Herz- oder Lungenerkrankungen oder Diabetes scheint ein höheres Risiko für die Entwicklung schwererer Komplikationen infolge der Erkrankung an COVID-19 zu bestehen [10].

Die Diagnose einer COVID-19-Infektion erfolgt zunächst durch Abklärung der üblichen Ursachen einer Lungenentzündung sowie anschließenden Nachweis mittels Sequenzierung der nächsten Generation oder Echtzeit-RT-PCR [1,11] Derzeit sind verschiedene Tests zum Nachweis von SARS-CoV-2 verfügbar, darunter China CDC (Zielregionen: ORF1ab und N), Charité – Deutschland (Zielregionen: RdRP und E) oder US CDC (zwei Zielregionen im N-Gen) [12].

Zur Erkennung von SARS-CoV-2 empfiehlt die CDC Proben aus den oberen Atemwegen, also nasopharyngeale Abstriche bzw. NP-Abstriche, oropharyngeale Abstriche bzw. OP-Abstriche, Abstriche der mittleren Nasenmuschel, Nasenabstriche, nasopharyngeale Spülungen bzw. Aspirate oder Nasenspülungen bzw. Nasenaspirate sowie Speichelproben, wobei die Probennahme vor allem durch medizinisches Fachpersonal erfolgt; weitere von der CDC empfohlene Möglichkeiten sind Proben aus den unteren Atemwegen, also Sputum, endotracheales Aspirat oder bronchoalveolare Lavage bei Patienten mit schwereren Atemwegserkrankungen.[11] Darüber hinaus können zusätzliche klinische Proben wie Blut, Urin und Stuhl entnommen werden, um das Vorliegen des Virus zu überwachen.[11,12]

Seit der ersten genomischen Charakterisierung von SARS-CoV-2 wurde das Virus in verschiedene genetische Gruppen, sogenannte Cluster (S, L, V, G mit den Untergruppen GH und GR) eingeteilt. Das Auftreten von Mutationen ist im Zuge der Weiterentwicklung des Virus ein natürliches, zu erwartendes Ereignis. Einige spezifische Mutationen sind auch bestimmend für die genetischen Gruppen des Virus, die derzeit weltweit im Umlauf sind. Die bislang identifizierten Mutationen liegen innerhalb der für ein Coronavirus zu erwartenden Muster. Die Viren der genetischen Gruppe G kommen weltweit am häufigsten vor. Die weltweit erfolgende genetische Sequenzierung des Erregers hat es möglich gemacht, bei der Ausbreitung und Weiterentwicklung des Virus Muster zu erkennen.

Am 14. Dezember 2020 meldete Großbritannien für einige Regionen des Landes einen Anstieg der Inzidenz von SARS-CoV-2 in Verbindung mit einer vermutlich stärker ansteckenden neuen Variante des Virus. Diese Variante, bezeichnet als Alpha-Variante (B.1.1.7), wies 23 verschiedene Mutationen auf: 13 nicht synchrone Mutationen, darunter eine Reihe von Mutationen im Spike-Protein (S), 4 Deletionen und 6 synchrone Mutationen. Bis Ende Dezember wurde diese Variante in 31 Ländern und Territorien aus 5 der 6 WHO-Regionen nachgewiesen. Bei einer der Mutationen handelt es sich um die Deletion an den Positionen 69 und 70 im Spike-Protein. Der Nachweis der Deletion HV-69/70 ist von großer Bedeutung, da diese Deletion mit nachlassender Immunität bei immunsupprimierten Patienten sowie einer höheren viralen Infektiosität in Verbindung gebracht wird. Weiterer Anlass zur Besorgnis im Zusammenhang mit der Deletion HV-69/70 ist die Tatsache, dass diese die Empfindlichkeit des auf das S-Gen bezogenen Virusnachweises mit molekularen Techniken (RT-PCR) beeinträchtigt.

Das Vorhandensein der Deletion HV-69/70 ist mit der Alpha-Variante, Linie B.1.1.7, assoziiert, aber auch andere Varianten wie B.1.1.298 (dänische Linie) und B.1.258 weisen diese Deletion auf.

Die Beta-Variante (B.1.351) wurde erstmals in Nelson Mandela Bay, Südafrika, in Proben von Anfang Oktober 2020 nachgewiesen. Die Variante wurde Ende Dezember 2020 auch in Sambia nachgewiesen; zu diesem Zeitpunkt schien sie die vorherrschende Variante innerhalb des Landes zu sein. Diese Variante enthält mehrere Mutationen im Spike-Protein, darunter K417N, E484K und N501Y. Sie zeigt eine potenzielle Reduktion im Hinblick auf die Neutralisierung durch manche monoklonale EUA-Antikörperbehandlungen.

Die SARS-CoV-2-Epidemie in Brasilien war von zwei Linien geprägt, die als P.1 und P.2 bezeichnet werden und Mutationen in der rezeptorbindenden Domäne des Spike-Proteins (S) aufweisen. Die Linie P.1 (bezeichnet als Gamma) gilt als besorgniserregende Variante (VOC, Variant of Concern), da sie eine potenzielle Reduktion im Hinblick auf die Neutralisierung durch manche monoklonale EUA-Antikörperbehandlungen zeigt. Diese Linie weist mehrere Mutationen im S-Protein auf (darunter K417T, E484K, N501Y), und ihr Auftreten wurde mit einer zweiten COVID-19-Epidemiewelle im Bundesstaat Amazonas in Verbindung gebracht. Die Linie P.2 gilt als zu überwachende Variante (VUM, Variant Under Monitoring) und weist lediglich die Mutation E484K auf. Die Linie P.2 wurde Ende 2020 und Anfang 2021 als die am weitesten verbreitete Variante in mehreren Bundesstaaten am Amazonas festgestellt.

Das Auftreten von Varianten, die die Übertragbarkeit des Virus beziehungsweise seine Virulenz erhöhen oder gegen die neutralisierende (nach Infektion oder Impfung gebildete) Antikörper unwirksam sind, stellt ein äußerst gravierendes Problem für die öffentliche Gesundheit dar, aus dem sich bedeutende Folgen für die Pandemiekontrolle ergeben können. Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System deshalb den Nachweis der Deletion HV 69/70 und der K417N- oder K417T-Mutationen, die mit den besorgniserregenden Varianten Alpha, Beta und Gamma assoziiert werden.

3. Verfahrensprinzip

Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde entwickelt für den qualitativen Nachweis von RNA mit Deletion HV-69/70, der K417N-Mutation und der K417T-Mutation im S-Gen von SARS-CoV-2 ausgehend von nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen sowie Speichelproben. Der Nachweis erfolgt per Echtzeit-RT-PCR-Verfahren in einem Schritt. Die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz erfolgen dabei in demselben Reaktionsgefäß. Die isolierte RNA-Zielsequenz wird mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Darauf folgt die Amplifikation einer konservierten Region des S-Gens von SARS-CoV-2 mit Deletion HV-69/70, der K417N-Mutation und der K417T-Mutation unter Verwendung spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase, Reverse Transkriptase) in stabilisierter Form sowie eine endogene interne Kontrolle zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität. Der Assay nutzt ein bei Menschen vorkommendes Housekeeping-Gen – das humane RNase P-Gen – für die endogene interne Kontrolle (IK). Humane Housekeeping-Gene sind an den grundlegenden Zellerhaltungsfunktionen beteiligt. Daher wird

davon ausgegangen, dass sie in allen kernhaltigen menschlichen Zellen vorliegen und relativ konstante Expressionsniveaus zeigen.

Zielsequenz	Kanal	Gen
Deletion HV-69/70	475/520	S-Gen
K417N-Mutation	530/565	S-Gen
K417T-Mutation	585/630	S-Gen
Endogene interne Kontrolle	630/665	humane RNase P-Gen

Tabelle 1. Zielsequenz, Kanal und Gene.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien:

Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe oder Strichcode	Menge
SARS-CoV-2 Variant reaction tube	Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und einer endogenen internen Kontrolle in stabilisierter Form	Grüne Folie	2 Beutel mit je 12 transparenten Röhrchen
Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	11-Folie	1 Beutel mit je 24 transparenten Röhrchen

Tabelle 2. Reagenzien und Materialien im VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit der Kat.-Nr. VS-USB124 (444216).

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der nachstehenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.-Nr. 442827 oder 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.-Nr.: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl)
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Optional: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215)

6. Transport- und Lagerbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 40 °C transportiert und gelagert werden.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel, die die Reaktionsgefäß enthalten, kann das Produkt bis zu 28 Tage lang verwendet werden.

7. Sicherheitshinweise für Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für den Gebrauch durch professionelle Anwender bestimmt, beispielsweise Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und Techniker, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro-Diagnostikum.*
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests in demselben allgemeinen Bereich des Labors durchgeführt werden, ist darauf zu achten, dass das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, alle für Tests erforderlichen zusätzlichen Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen die Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) beziehungsweise Desoxyribonuklease (DNase). Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spalte. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen (BD MAX™ PCR Cartridge) müssen die Handschuhe gewechselt werden.
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.

- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für VIASURE Real Time PCR Detection Kits aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da Stoffe und/oder Gemische, die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die Gefahrenstufe einfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.
- Wenn das Kit in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet wird, beachten Sie bitte die zugehörige Gebrauchsanleitung.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch zum BD MAX™ System.

8. Testverfahren

8.1. Probenentnahme, -lagerung und Transport

Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde getestet an nasopharyngealen Abstrichen und Speichelproben, die beide in Virenlösungsmittel (VTM) aufbewahrt wurden – Vircell S.L., BD™ Universal Viral Transport (UVT) System, BD oder IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM), Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd – sowie an oropharyngealen Abstrichen, die in Virenlösungsmittel (VTM) – Vircell – aufbewahrt wurden. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Im Allgemeinen sind Atemwegsabstriche und Speichelproben in sauberen und ordnungsgemäß gekennzeichneten Behältern mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) aufzubewahren und schnellstmöglich zu verarbeiten, um die Testqualität zu sichern. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material und nicht länger als 72 Stunden bei 2 bis 8 °C transportiert werden. Für den Langzeittransport (über 72 Stunden) empfehlen wir Temperaturen von -20 °C oder darunter. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu verwenden. Die Proben können bei 2 bis 8 °C bis zu 72 Stunden lang oder zur Konservierung bei -20 °C oder idealerweise bei -70 °C gefroren gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden, um eine Schädigung der Proben und Nukleinsäuren zu vermeiden.

Die nasopharyngealen/oropharyngealen Abstriche und Speichelproben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines). Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> und 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>) und IDSA-Leitlinie (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. Probenvorbereitung und RNA-Extraktion

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktionskits BD MAX™ ExK™ TNA-3 aufgeführten Empfehlungen durchführen. Bitte beachten Sie, dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern. Applikationsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion sind vom Benutzer zu bestimmen und zu validieren.

Bei Verwendung von nasopharyngealen oder oropharyngealen Proben:

1. Pipettieren Sie zwischen 400 und 750 µL des in Virustransportmedium (VTM) oder in BD™ Universal Viral Transport (UVT) System aufbewahrten nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichs in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, und verschließen Sie das Röhrchen mit einer Septumkappe. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation fort.

Bei Verwendung von in Transportmedium aufbewahrten Speichelproben:

1. Speichelproben können in Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) oder IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) in einem Verhältnis von 1:3 (Speichel:Medium) entnommen werden. Mischen Sie die Probe 1 Minute bei hoher Geschwindigkeit auf einem Vortex-Schüttler. Pipettieren Sie 750 µl in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, und verschließen Sie das Röhrchen mit einer Septumkappe. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation fort.

Bei Verwendung von unvermischten Speichelproben:

1. Versetzen Sie den Speichel mit Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) oder IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM), sodass das endgültige Verhältnis 1:3 (Speichel:Medium) beträgt. Mischen Sie die Probe 1 Minute bei hoher Geschwindigkeit auf einem Vortex-Schüttler. Pipettieren Sie anschließend 750 µl in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, und verschließen Sie das Röhrchen mit einer Septumkappe. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation fort.

8.3. PCR-Protokoll

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

8.3.1. Anlegen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie bereits den Test das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System angelegt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt mit Schritt 8.3.2 fortfahren.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).

- 3) Benennen Sie in der Registerkarte mit den grundlegenden Informationen im Fenster „Test Name“ Ihren Test als „VIASURE SARS-CoV-2 Variant“.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) verwendet werden. Wählen Sie in dem Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master-Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert), und stellen Sie das Probenvolumen auf 950 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder eine höhere Version verwenden, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Benutzerdefinierte Strichcodes) die folgende Konfiguration:
 - a. „Snap-In 2 Barcode“ (Barcode für Snap-In 2): leer lassen (bei SARS-CoV-2 Variant reaction tube ist keine Strichcode-Konfiguration erforderlich).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (für das Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode (Barcode für Snap-In 4): 1G bei Einsatz in Kombination mit SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube und Format „Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5); Abschnitt 8.3.1).
- 9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 3).
 - a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet werden. Wählen Sie in dem Fall die Option „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) und bei „Test Steps“ (Testschritte) die Einrastposition Snap-In 4 (blau); beachten Sie bitte die zugehörige Gebrauchsanleitung.

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	HV69-70	80	150	0	40
530/565 (HEX)	K417N	80	150	0	40
585/630 (ROX)	K417T	80	150	0	40
630/665 (Cy5)	IC	80	150	0	35
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 3. PCR settings (PCR-Einstellungen).

Hinweis: Es empfiehlt sich, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzugehen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 10) Geben Sie in der Registerkarte „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) auch die folgenden Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung) (Tabelle 4) ein.

		False Receiving Channel (Falsch-empfänger Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	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	5,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabelle 4. Parameter für das „Spectral Cross Talk“ (spektrale Übersprechen).

- 11) Geben Sie in der Registerkarte „Test Steps“ (Testschritte) das PCR-Protokoll (Tabelle 5) ein.

Step Name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit(en))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Reverse transcription (Reverse Transkription)	Hold	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	Hold	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung))	2-Temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabelle 5. PCR-Protokoll.

- 12) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save Test“ (Test speichern).

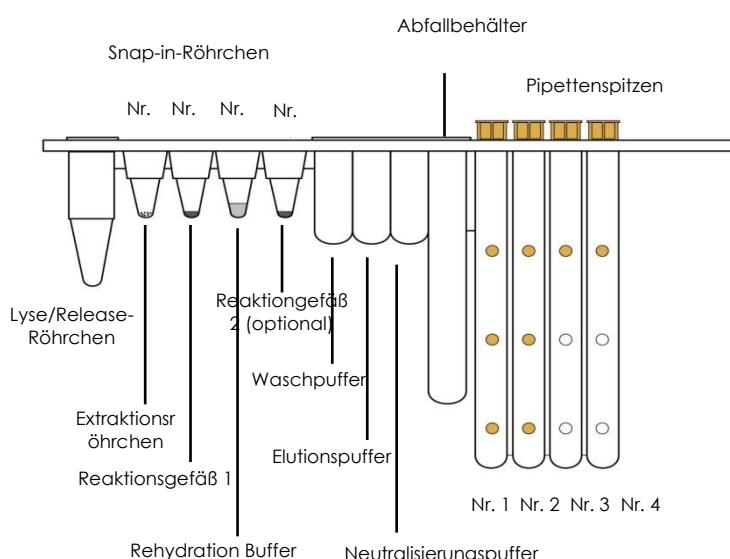
8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (Extraktionsröhrchen, B4, weiße Folie) aus den Schutzbeuteln. Lassen Sie das bzw. die Extraction Tube(s) – weiße Folie – in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an SARS-CoV-2 Variant reaction tubes (grüne Folie), und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1).
 - Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydration bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
 - Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit

Rehydrationspuffer (Typ 5); siehe Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie die benötigte Anzahl an zusätzlichen SARS-CoV-2 reaction tubes (1G-Folie bei VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test), und lassen Sie sie in ihre entsprechende Position im Streifen einrasten (Einrastposition 4, blaue Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.

- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydration Buffer tubes (11-Folie), und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
 - a. Achten Sie für eine korrekte Überführung bitte darauf, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich der gesamte Puffer am Boden des Röhrchens befindet.

Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit.



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option SARS-CoV-2 Variant (sofern diese noch nicht angelegt wurde, führen Sie bitte die in Abschnitt 8.3.1 aufgeführten Schritte aus).
- 3) Wählen Sie (optional) im Auswahlmenü die entsprechende Chargennummer des Kits (zu finden an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits).
- 4) Erfassen Sie die Identifikationsnummer des „Sample Buffer Tube“ (Probenpufferröhrchens) im „Sample Tube“-Fenster (Probenröhren) der „Work List“ (Arbeitsliste) durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der „Work List“ (Arbeitsliste) aus, und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen

Sie diese Schritte für sämtliche Sample Buffer Tubes (Probenpufferröhrchen) aus. Vergewissern Sie sich, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.

- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Sample Buffer Tube Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.
- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start Run“ (Durchlauf starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.4. BD MAX™ Bericht

- 1) Klicken Sie im Hauptmenü auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder drücken Sie auf die Schaltfläche „View“ (Ansicht).
- 3) Klicken Sie auf „Print“ (Drucken) und wählen Sie folgende Optionen aus: „Run Details, Test Details and Plot...“ (Durchlaufdetails, Testdetails und Plot ...).
- 4) Klicken Sie im Bildschirm „Run Reports“ (Durchlaufberichte) auf die Schaltfläche „Print“ (Drucken) oder „Export“.

9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Analyse mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist vorgesehen als Reflex-Test bei Proben mit positivem Ergebnis für SARS-CoV-2-RNA. Bei Einsatz in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (*N1 + N2*) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für Proben mit unbekanntem Status hinsichtlich des Vorhandenseins von SARS-CoV-2-RNA beachten Sie bitte diese Gebrauchsanleitung für die Interpretation der Ergebnisse.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 3). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.

- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.

- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 6 auszuwerten.

Überprüfen Sie das Signal der internen Kontrolle, um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störung des BD MAX™ Systems gemeldet wurde.

Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle abzulesen und auszuwerten:

Zielsequenz Deletion HV- 69/70 (475/520)	Zielsequenz K417N-Mutation (530/565)	Zielsequenz K417T-Mutation (585/630)	Endogene interne Kontrolle (630/665)	Interpretation
+	-	-	+/- ¹	Deletion HV-69/70 nachgewiesen¹
-	+	-	+/- ¹	K417N-Mutation nachgewiesen¹
-	-	+	+/- ¹	K417T-Mutation nachgewiesen¹
+	+	-	+/- ¹	Deletion HV-69/70 und K417N-Mutation nachgewiesen¹
+	-	+	+/- ¹	Deletion HV-69/70 und K417T-Mutation nachgewiesen¹
-	+	+	+/- ¹	K417N- und K417T-Mutationen nachgewiesen¹
+	+	+	+/- ¹	Deletion HV-69/70, K417N-Mutation und K417T- Mutation nachgewiesen¹
-	-	-	+ ¹	Deletion HV-69/70, K417N-Mutation und K417T- Mutation nicht nachgewiesen¹
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR- Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbares Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 6. Probenauswertung.

+: Amplifikation erfolgt.

-: Keine Amplifikation erfolgt.

1 Eine Probe gilt als positiv, wenn der erhaltene Ct-Wert unter 40 liegt. Die endogene interne Kontrolle (IK) kann ein Amplifikationssignal ergeben oder auch nicht. Gelegentlich ist der Nachweis der IK nicht notwendig, da das Vorliegen einer hohen Kopienzahl der Ziel-Nukleinsäure zu deren präferenzieller Amplifikation führen kann.

2 Im Fall eines negativen Ergebnisses bei den Zielregionen Deletion HV-69/70, K417N-Mutation und K417T-Mutation muss die IK ein Amplifikationssignal mit einem Ct-Wert von weniger als 35 zeigen. Der Ct-Wert kann sehr variabel sein wegen der endogenen internen Kontrolle in Form eines humanen Housekeeping-Gens, das in allen kernhaltigen menschlichen Zellen in der Originalprobe vorliegen sollte. Wenn kein Signal vorhanden ist oder der Ct-Wert der endogenen internen Kontrolle ≥ 35 beträgt, wird das Ergebnis als unklar betrachtet, und der Test muss wiederholt werden.

Zusammenfassung der Mutationen, die mit den folgenden Linien assoziiert sind, die in den bekanntesten besorgniserregenden Varianten (VOC) vorkommen:

Linien	WHO-Kennzeichnung	Mutationen auf dem S-Gen ¹		
		Deletion HV-69/70	K417N-Mutation	K417T-Mutation
B.1.1.7	Alpha	X	-	-
B.1.351	Beta	-	X	-
P.1	Gamma	-	-	X

Tabelle 7. Zusammenfassung der Mutationen, die mit bekannten besorgniserregenden Varianten (VOC) assoziiert sind.

¹<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> (Daten bis zum 19. Mai 2021).

Andere Varianten können die Deletion HV 69/70 und die Mutationen K417T und K417N aufweisen, da sie nicht spezifisch für die genannten Varianten sind.

Eine endgültige Zuordnung zu einer Linie muss durch Sequenzierung erfolgen.

Im Fall eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, die Gebrauchsanleitung und das vom Benutzer verwendete Extraktionsverfahren zu prüfen, die ordnungsgemäße Ausführung aller RT-qPCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter zu prüfen und zu kontrollieren, ob die Kurvenform sigmoid und die Intensität der Fluoreszenz angemessen ist.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einer Gesundheitsfachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, wurde bisher aber nur mit nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichen und Speichelproben validiert, die alle in Virentransportmedium (VTM) aufbewahrt wurden.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.

- Es besteht die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination durch SARS-CoV-2-RNA mit Deletion HV-69/70, K417N-Mutation oder K417T-Mutation im S-gen entweder bei Proben, die hohe Konzentrationen an Ziel-RNA enthalten, oder durch Kontamination aus PCR-Produkten früherer Reaktionen.
- Die beim VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System zum Nachweis der Deletion HV-69/70, K417N-Mutation oder K417T-Mutation eingesetzten spezifischen Primer- und Sondenkombinationen weisen keine signifikanten kombinierten Homologien mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora oder anderen Coronaviren auf, die zu vorhersehbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnte.
- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:
 - unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion);
 - Abbau der viralen RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-Varianten beeinträchtigen können;
 - eine Viruslast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
 - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen. Der Einfluss von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, die zur Prävention von COVID-19 oder zur Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurde nicht untersucht;
 - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Einige Proben ergeben wegen einer zu geringen Zellzahl in der klinischen Originalprobe u. U. keine Amplifikationskurven für RNase P. Ein negatives IK-Signal schließt das Vorhandensein der Deletion HV-69/70, K417N-Mutation oder K417T-Mutation in einer klinischen Probe nicht aus.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Viren vorliegen oder dass diese Viren infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit viraler Zielsequenzen hin.
- Das Vorhandensein der Deletion HV 69/70 ist mit der Alpha-Variante (Linie B.1.1.7), die K417N-Mutation mit der Beta-Variante (Linie B.1.351) und die K417T-Mutation mit der Gamma-Variante (Linie P.1) assoziiert, die endgültige Zuordnung zu einer Linie muss jedoch durch Sequenzierung erfolgen.
- Negative Ergebnisse schließen das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA nicht aus, da dieser Assay für die Verwendung mit positiven SARS-CoV-2-Proben vorgesehen ist.
- Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmbaren (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine Testwiederholung erforderlich. Unklare Ergebnisse (UNR) können durch Hemmsubstanzen in der Probe oder eine nicht korrekte Rehydrierung des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Reaktionsgefäß eine endogene interne Kontrolle (IK), mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde mit klinischen Proben aus den Atemwegen (Nasopharyngealabstrichen) von Patienten mit Verdacht auf eine Atemwegsinfektion getestet. Die Ergebnisse waren wie folgt:

Untersuchungsstelle	Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1 CerTest Biotec S.L (Saragossa, Spanien)	Nasopharyngealabstrich	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Deletion HV-69/70 K417T-Mutation K417N-Mutation

Tabelle 8. Ort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Wahr positive und wahr negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte sowie Sensitivität und Spezifität beim VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurden in Relation zu verschiedenen Vergleichstests berechnet, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist:

Untersuchungsstelle	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
1 TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, molekularer Assay und Sequenzierung	Deletion HV-69/70	48	167	0	2	96% (85–99)	100% (97–100)	
	K417T-Mutation	50	167	0	0	100% (91–100)	100% (97–100)	
	K417N-Mutation	7	209	0	1	88% (46–99)	100% (97–100)	

Tabelle 9. Wahr positive (TP) und wahr negative (TN) Werte, falsch positive (FP) und falsch negative (FN) Werte sowie Sensitivität und Spezifität beim VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Die Ergebnisse zeigen beim Nachweis der HV 69/70-Deletion, K417T- und K417N-SARS-CoV-2-Mutationen mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System Übereinstimmung.

Zur Beurteilung der Kompatibilität verschiedener Probenmatrizen (nasopharyngeale Abstriche, oropharyngeale Abstriche und nasopharyngeale/oropharyngeale Abstriche in Virenlösungsmittel von Vircell) wurde eine Kompatibilitätsstudie durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die drei verschiedenen Probenmatrizen mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kompatibel sind.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Ergebnisse zur Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit einer Positivrate von ≥ 95% lauten wie folgt:

- Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) von ≥ 2 Genomkopien/Reaktion bei nasopharyngealen Proben und ≥ 5 Genomkopien/Reaktion bei Speichelproben für die HV 69/70-Deletion, gemessen mittels der SARS-CoV-2 B.1.1.7-Linie.
- Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) von ≥ 5 Genomkopien/Reaktion bei nasopharyngealen Proben und

≥ 5 Genomkopien/Reaktion bei Speichelproben für die K417N-Mutation, gemessen mittels der SARS-CoV-2 B.1.351-Linie.

- c) Das VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) von ≥ 10 Genomkopien/Reaktion bei nasopharyngealen Proben und ≥ 15 Genomkopien/Reaktion bei Speichelproben für die K417T-Mutation, gemessen mittels der SARS-CoV-2 P.1-Linie.

Abbildung 2. Verdünnungsreihe der SARS-CoV-2-Variante (Deletion HV-69/70) (synthetische cDNA) ($5,3 \cdot 10^5$ - $5,2 \cdot 10^1$ Genomkopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

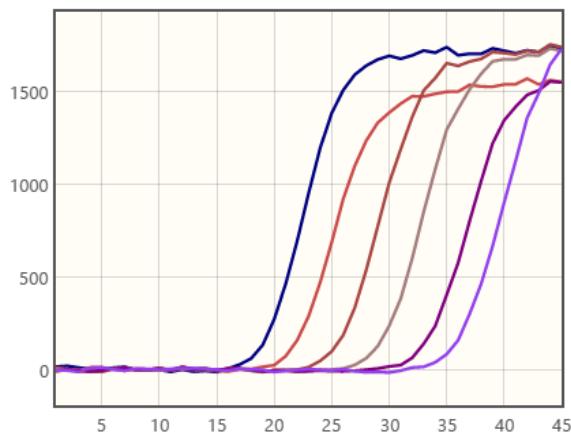


Abbildung 3. Verdünnungsreihe der SARS-CoV-2-Variante (K417N-Mutation) (synthetische cDNA) ($5,3 \cdot 10^5$ - $5,2 \cdot 10^1$ Genomkopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 530/565 (HEX)).

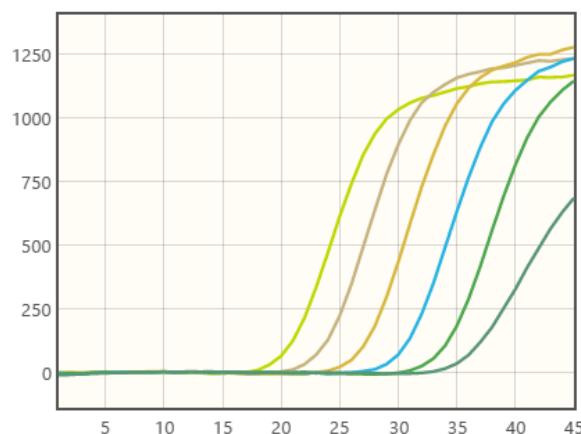
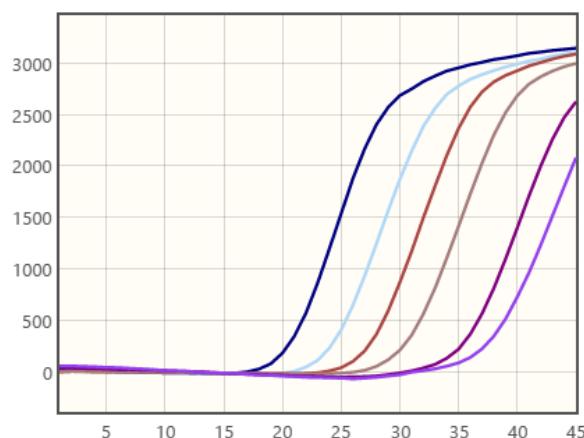


Abbildung 4. Verdünnungsreihe der SARS-CoV-2-Variante (K417T-Mutation) (synthetische cDNA) ($5,3 \cdot 10^5$ - $5,2 \cdot 10^1$ Genomkopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 585/630 (ROX)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des SARS-CoV-2-Assays wurde bestätigt durch Testen eines Panels mit verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen konnte eine Kreuzreakтивität festgestellt werden:

Test auf Kreuzreaktionen				
Humanes Adenovirus, Typen 1-5, 8, 15, 31, 40 und 41	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09-Virus	-	Mycoplasma pneumoniae
Bocavirus	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09-Virus	-	Mycobacterium tuberculosis
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)-Virus	-	Humane Parainfluenza-Viren 1, 2, 3 und 4
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)-Virus	-	Pneumocytis jirovecii Typ A1 und g885652
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)-Virus	-	Humanes Rhinovirus
Bordetella pertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)-Virus	-	Respiratorisches Synzytialvirus (RSV) A/B
Chlamydia caviae	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)-Virus	-	SARS Coronavirus Stamm Frankfurt-1
Chlamydia psittaci Genotyp A und C	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-Virus	-	Menschlicher 2019-nCoV-Stamm BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Menschlicher 2019-nCoV-Stamm 2019-nCoV/Italy-INMI1*
Humanes Coronavirus 229E, OC43, NL63 und HKU1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013-Virus	-	MT007544.1(SARS-CoV-2-Isolat Australia/VIC01/2020)*
MERS-Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06-Virus	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2-Isolat Wuhan-Hu-1)*
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 und B3	-	Legionella bozemani	-	SARS-CoV-2-Stamm 2019nCoV/USAWA1/2020*
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella dumoffii	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*
Enterovirus 68, 71	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-	Streptococcus pneumoniae
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09 Virus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes

Tabelle 10. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

* Bitte beachten: Der Nachweis dieser SARS-CoV-2-Stämme wird bei diesem Assay nicht berücksichtigt. Dieser Test dient dem qualitativen Nachweis der Deletion HV 69/70, der K417N-Mutation und der K417T-Mutation im S-Gen, die unter anderem in den SARS-CoV-2-Varianten Alpha, Beta und Gamma (Linien B.1.1.7, B.1.351 und P.1) vorkommen.

12.4. Analytische Reaktivität

Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde evaluiert anhand von synthetischen RNA-Kontrollen für zwei verschiedene Sequenzen, die mit der Alpha-Variante (B.1.1.7_710528 UK und B.1.1.7_601443 UK) assoziiert sind, eine Sequenz, die mit der Beta-Variante assoziiert ist (Kontrolle 16, SARS-CoV-2-Linie B.1.351 Südafrika/KRISP-ECK005299/2020) und eine Sequenz, die mit der Gamma-Variante assoziiert ist (Kontrolle 17, SARS-CoV-2-Linie P.1 Japan/Brasilianische Variante Japan/IC-0564/2021); dabei fielen die Ergebnisse positiv aus.

Bibliography/ Literatur

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/NEJMoa2001017.
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/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/item/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance> Accessed January 2021.
21. Enfermedad por coronavirus, COVID-19, Información Científica-técnica. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, España. 01-2021.
22. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Emerging SARS-CoV-2 Variants. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html> Accessed May 2021
23. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html> Accessed May 2021.
24. Brief report: New Variant Strain of SARS-CoV-2 Identified in Travelers from Brazil (NIID, Japan) Available from <https://www.niid.go.jp/niid/en/2019-ncov-e/10108-covid19-33-en.html> Accessed May 2021.
25. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. Available from <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586> Accessed May 2021.
26. Tegally H et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. medRxiv 2020; doi: 10.1101/2020.12.21.20248640

Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

IVD	In vitro diagnostic device In-vitro-Diagnostikum		Keep dry Trocken aufbewahren		Use by Verfallsdatum		Manufacturer Hersteller	LOT	Batch code (Lot) Chargennummer
	Consult instructions for use Siehe Gebrauchsanweisung		Temperature limitation Temperaturbegrenzung		Contains sufficient for <n> test Ausreichend für <n> Test(s)	DIL	Sample diluent Probenverdünner	REF	Catalognumber Katalognummer

Trademarks

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

Change Control / Änderungshistorie		
Version No. / Versionsnr.	Changes / Änderungen	Date / Datum
00	Original version / Ursprüngliche Version.	07/07/2021
01	New targets included in the product design. Change of the variants names to meet the WHO naming SARS-CoV-2 variants criteria. / Neue Zielsequenzen im Design berücksichtigt. Änderung der Variantenbezeichnungen entsprechend den WHO-Kriterien für die Benennung von SARS-CoV-2-Varianten.	10/08/2021

Table A 2. Control change table/ Tabelle zur Änderungshistorie.

Revision: 10th August 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

