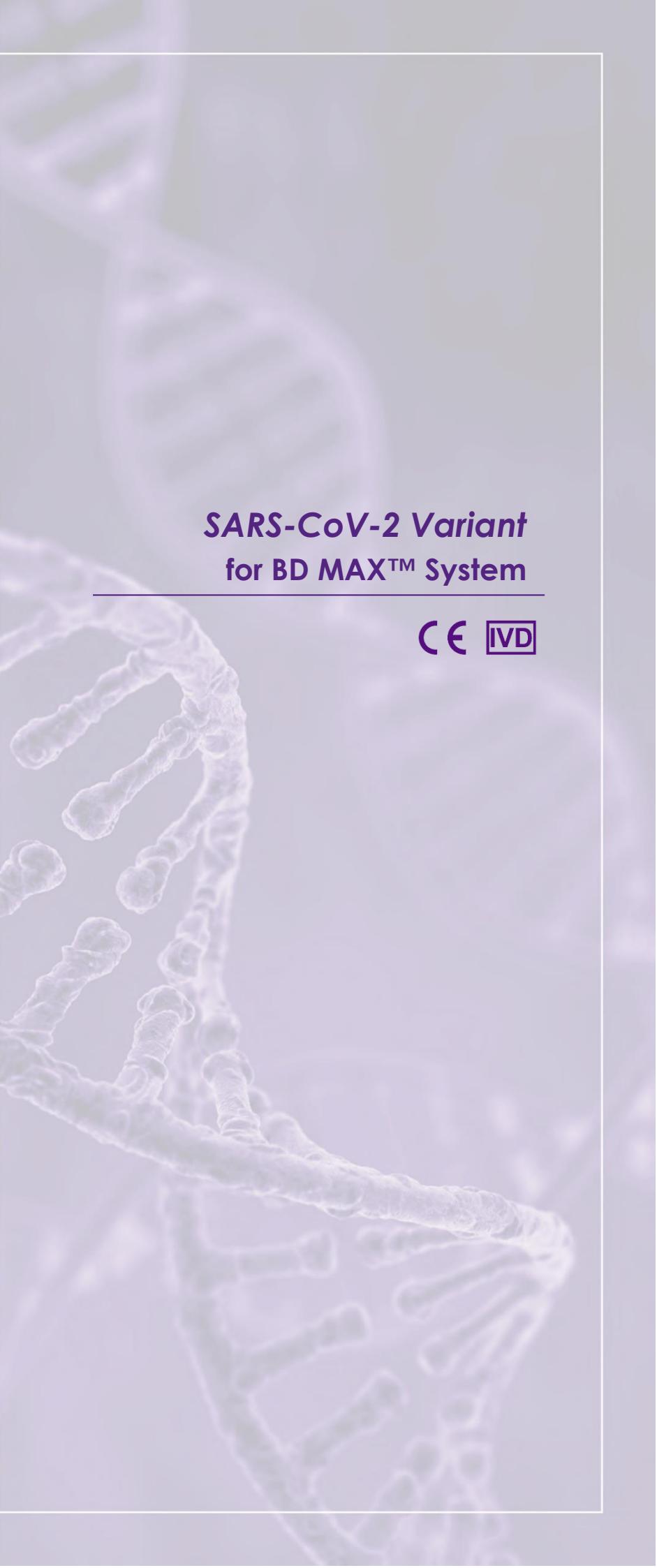




**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



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

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / Denne bruksanvisningen gjelder for følgende referanse:

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

## 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

## Innhold

1.	Tiltenkt bruk .....	22
2.	Sammendrag og forklaring .....	22
3.	Grunnleggende prosedyre .....	24
4.	Reagenser som følger med.....	24
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren .....	25
6.	Transport- og lagringsforhold .....	25
7.	Forholdsregler for brukere.....	25
8.	Testprosedyre.....	26
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	26
8.2.	Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon.....	27
8.3.	PCR-protokoll .....	28

---

9.	Tolkning av resultater .....	31
10.	Testens begrensninger .....	33
11.	Kvalitetskontroll .....	34
12.	Ytelsesegenskaper .....	35
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet .....	35
12.2.	Analytisk sensitivitet .....	35
12.3.	Analytisk spesifisitet .....	37
12.4.	Analytisk reaktivitet .....	38
	Bibliography/ Bibliografi.....	39
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	40
	Trademarks.....	40

## **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.

	Channel	False Receiving 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.

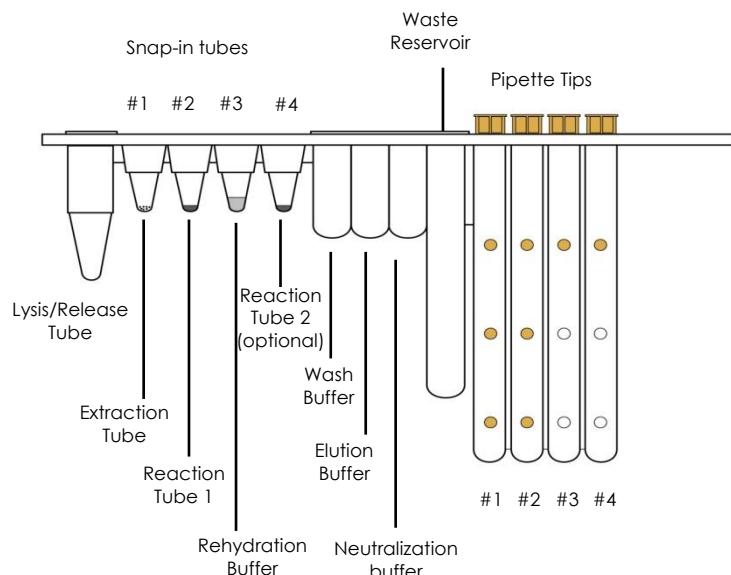
- 12) Click the "Save Test" button.

### 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
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	<b>HV 69/70 deletion Detected<sup>1</sup></b>
-	+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>K417N mutation Detected<sup>1</sup></b>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>K417T mutation Detected<sup>1</sup></b>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>HV 69/70 deletion and K417N mutation Detected<sup>1</sup></b>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>HV 69/70 deletion and K417T mutation Detected<sup>1</sup></b>
-	+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>K417N and K417T mutation Detected<sup>1</sup></b>
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation Detected<sup>1</sup></b>
-	-	-	+ <sup>1</sup>	<b>HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation not Detected<sup>1</sup></b>
-	-	-	- <sup>2</sup>	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. <sup>2</sup>
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  $\geq 35$  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 <sup>1</sup>		
		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).

<sup>1</sup><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:

	<b>Site</b>	<b>Sample type</b>	<b>Workflow</b>	<b>Target</b>
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:

<b>Site</b>	<b>Comparator assay</b>	<b>Target</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>
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) ( $5.3 \times 10^5$  -  $5.2 \times 10^1$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

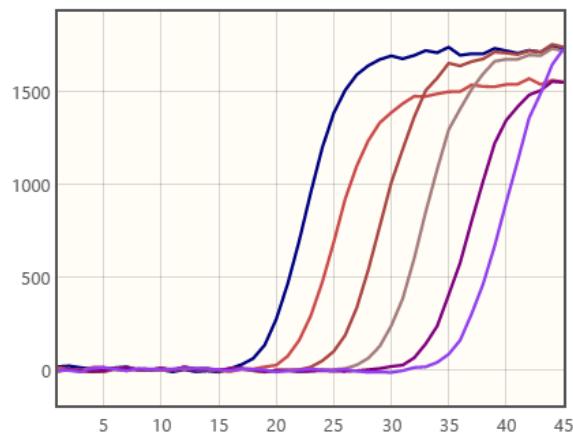


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417N mutation) (synthetic cDNA) ( $5.3 \times 10^5$  -  $5.2 \times 10^1$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

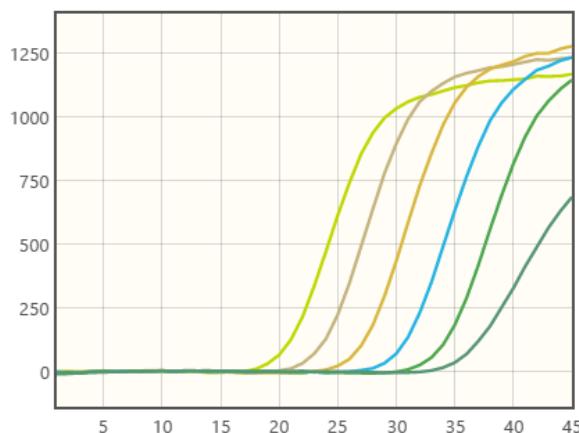
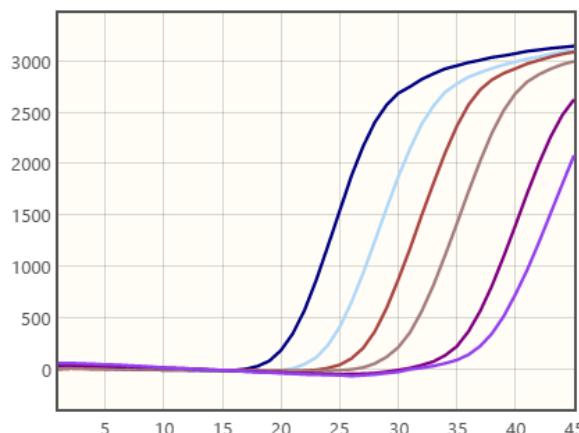


Figure 4. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417T mutation) (synthetic cDNA) ( $5.3 \times 10^5$  -  $5.2 \times 10^1$  genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



## 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.

## NORSK

### 1. Tiltenkt bruk

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatisert RT-PCR-test i sanntid, utformet for en kvalitativ deteksjon av delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon og K417T-mutasjon i S-genet av SARS-CoV-2, knyttet til variantene SARS-CoV-2 Alpha (linje B.1.1.7), Beta (linje B.1.351) og Gamma (linje P.1), i nasofaryngeale og orofaryngeale prøvepensler og spyttprøver.

Analysen er ment for bruk med positive prøver for SARS-CoV-2 eller, hvis testen utføres sammen med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215) med prøver fra pasienter som mistenkes å være positive for Coronavirus 2019 (COVID-19) av deres helseprofessionell.

Denne testen er ment som en hjelp i overvåking av prevalensen av varianter som er bærere av delesjon HV 69/70 eller mutasjoner av K417N eller K417T i S-genet, og som en hjelp i kontrolltiltak. Analysen bruker BD MAX™ System til automatisert ekstraksjon av RNA og påfølgende sanntids RT-PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmateriell for BD MAX™-systemet. RNA ekstraheres fra prøver, og komplementært DNA (cDNA) syntetiseres og forsterkes ved bruk av RT-PCR og påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for delesjon HV 69/70, eller K417N eller K417T-mutasjoner.

### 2. Sammendrag og forklaring

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

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

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

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

CDC anbefaler at det tas prøver fra de øvre luftveier (nasofaryngeale (NP) og orofaryngeale (OP) prøvepensler, prøvepensel til midtre nesemusling, nasal prøvepensel, nasofaryngeal skylling/aspirat eller nasal skylling/aspirat og spyttprøver innsamlet hovedsakelig av helsepersonell) og/eller de nedre luftveier (sputum, endotrakealt aspirat eller bronkoalveolær lavage (BAL)) for identifikasjon av SARS-CoV-2 [11]. I tillegg kan det innsamles andre kliniske prøver, som blod, urin og avføring, for å overvåke tilstedeværelse av viruset [11,12].

Siden den opprinnelige genomiske karakteriseringen av SARS-CoV-2 har viruset blitt inndelt i forskjellige genetiske grupper eller klustere (S, L, V, G med undergrupper GH og GR). At mutasjoner dukker opp er en naturlig og forventet hendelse i et virus' evolusjonsprosess. Faktisk definerer enkelte spesifikke mutasjoner de virale gengruppene som sirkulerer globalt på nåværende tidspunkt. De mutasjonene som er identifisert per dags dato holder seg innen forventede mønstre for et koronavirus. Viruset klassifisert i genetisk gruppe G er de hyppigste på verdensbasis. Takket være genetisk sekvensering av patogenet verden over har det vært mulig å fastslå mønstre for virusets spredning og evolusjon.

14. desember 2020 erklærte Storbritannia en økning i forekomsten av SARS-CoV-2 i noen regioner av landet i forbindelse med en ny variant av viruset med en antatt større overføringskapasitet. Denne varianten, kalt Alpha (B.1.1.7), presenterte 23 forskjellige mutasjoner: 13 ikke-synonyme, inkludert en serie mutasjoner i spikeproteinet (S), 4 delesjoner og 6 synonymer. Ved slutten av desember hadde denne varianten blitt påvist i 31 land og territorier i 5 av de 6 WHO-regionene. Én av mutasjonene er delesjonen av posisjonene 69–70 i spikeproteinet. Påvisning av delesjon HV 69/70 er svært viktig siden den har blitt relatert til immunlekkasje hos immunsupprimerte pasienter og til økt virusinfektivitet. En annen årsak til bekymring i forbindelse med delesjon HV 69/70 er at den rammer sensitiviteten ved påvisning av viruset med bruk av molekylære teknikker (RT-PCR) som påviser S-genet.

Tilstedeværelse av delesjon HV 69/70 er forbundet med Alpha-varianten, avstamning B.1.1.7; imidlertid har andre varianter, som f. eks. B.1.1.298 (dansk avstamning) eller B.1.258, også denne delesjonen.

Beta-varianten (B.1.351) ble først identifisert i Nelson Mandela Bay, Sør-Afrika, i prøver som daterer tilbake til begynnelsen av Oktober 2020. Denne varianten ble også identifisert i Zambia i slutten av desember 2020, på et tidspunkt hvor den så ut til å være den dominante varianten i landet. Denne varianten har multiple mutasjoner i spikeproteinet, inkludert K417N, E484K, N501Y. Den har potensiell reduksjon i nøytralisering av enkelte EUA monoklonale antistoffbehandlinger.

SARS-CoV-2-epidemen i Brasil var dominert av to linjer designert som P.1 og P.2, som inkluderte mutasjoner i det reseptorbindende domenet av spikeproteinet (S). Linje P.1 (henvist til som Gamma) regnes som en bekymringsverdig variant (Variant of Concern, VOC) da den har potensiell reduksjon i nøytralisering av enkelte EUA monoklonale antistoffbehandlinger. Denne linjen presenterer multiple mutasjoner i S-proteinet (inkludert K417T, E484K, N501Y) og dens framtreden var assosiert med den andre COVID-19 epidemibølgen i delstaten Amazonas. Linjen P.2 regnes som en variant under overvåkning (Variant Under Monitoring, VUM), og inkluderer bare mutasjonen E484K. Linjen P.2 har blitt sporet som den mest vanlige varianten i flere delstater i Amazonas på tvers av landet i siste delen av 2020 og tidlig i 2021.

At det dukker opp varianter som øker overføring av viruset, dets virulens eller som unnslipper virkningen av nøytraliserende antistoffer som dannes etter naturlig infeksjon eller vaksine, utgjør et svært viktig offentlig helseproblem som kan ha en stor innvirkning på kontrollen av pandemien. Derfor muliggjør VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System påvisning av delesjon HV 69/70, og K417N- eller K417T-mutasjoner assosiert med overvåkningsvariantene Alpha, Beta og Gamma.

### 3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er designet for kvalitativ påvisning av RNA fra delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon og K417T-mutasjon i S-genet fra SARS-CoV-2 i nasofaryngeale og orofaryngeale prøvepensler og spyttprøver. Påvisningen utføres i ettrinns, sanntids RT-PCR-format, der revers transkripsjon og påfølgende amplifikasjon av den spesifikke målsekvensen skjer i samme reaksjonsrør. Det isolerte RNA-målet transkriberes og genererer komplementært DNA via revers transkriptase. Deretter amplifiseres et konservert område av S-genet for SARS-CoV-2 for delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon og K417T-mutasjon ved hjelp av spesifikke primere og fluorescensmerkede prober.

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

Hvert rør i VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase og revers transkriptase) i et stabilisert format, samt en endogen intern kontroll til monitorering av ekstraksjonsprosessen og/eller hemming av polymeraseaktiviteten. Analysen benytter et humant housekeeping-gen som endogen intern kontroll (IC) (humant RNase P-gen). Humane housekeeping-gener er involvert i grunnleggende cellevedlikehold og er derfor forventet å være til stede i alle nukleære humane celler og opprettholde relativt konstante genuttrykksnivå.

Mål	Kanal	Gen
Delesjon HV 69/70	475/520	S-gen
K417N-mutasjon	530/565	S-gen
K417T-mutasjon	585/630	S-gen
Endogen intern kontroll (IC)	630/665	humant RNase P-gen

Tabell 1. Mål, kanal og gener.

### 4. Reagenser som følger med

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderer følgende materialer og reaganer, nærmere beskrevet i tabell 2:

Reagens/Materiale	Beskrivelse	Farge eller strekkode	Mengde
SARS-CoV-2 Variant reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffer, dNTP-er, stabilisatorer og endogen intern kontroll i et stabilisert format	Grønn folie	2 poser à 12 blanke rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11-folie	1 poser à 24 blanke rør

Tabell 2. Reagenser og materialer som følger med i VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med katalognummer VS-USB124 (444216).

## 5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

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

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Filterspisser
- Pudderfrie engangshansker.
- Valgfritt: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215)

## 6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan produktet brukes i opptil 28 dager.

## 7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forsegler ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelseseskken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.

- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, ekstraksjonssettet BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™ System. Unngå alltid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement" pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hanske før du håndterer reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner må du ikke brekke åpen BD MAX™ PCR Cartridge etter bruk. Forseglingen på BD MAX™ PCR Cartridge er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklaer, engangshanske, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk, røyk eller påfør kosmetiske produkter i arbeidsområdet. Vask hendene når testen er utført.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og/eller biologisk farlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og de må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, håndtering og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for VIASURE Real Time PCR Detection Kits ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelige fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.
- Hvis settet brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), referer til den gjeldende bruksanvisningen.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™ System for ytterligere advarsler, forsiktigheitsregler og prosedyrer.

## 8. Testprosedyre

### 8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har blitt testet på nasofaryngeale prøvepensler og spyttprøver, begge samlet inn i virustransportmedium (VTM) – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD – eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) –Guangzhou Improve

Medical Instruments Co. Ltd og orofaryngeale prøvepensler samlet inn i virustransportmedium (VTM) – Vircell. Andre typer prøver må valideres av brukeren.

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

Nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og spyttprøver skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (Specimen collection guidelines), nettstedet <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> og midlertidige retningslinjer for innsamling, håndtering og testing av kliniske prøver for COVID-19 nettstedet <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) og IDSA's retningslinjer (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018), og artikkelen A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

## **8.2. Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon**

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

Ved bruk av nasofaryngeale og orofaryngeale prøver:

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

Ved bruk av spyttprøver samlet inn i transportmedium:

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

Ved bruk av rene spyttprøver:

1. Kombiner spytt med virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) slik at det endelige forholdet er 1:3 (spytt:medium). Kjør i virvelblander på høy hastighet i ett minutt. Pipettér deretter 750 µl ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube og lukk røret

med en membranhette. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

### **8.3. PCR-protokoll**

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner.

#### **8.3.1. Opprette PCR-testprogram for VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System**

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

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermbildet "Run" (Kjør) på BD MAX™ System.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i fanen "Basic Information" (Grunnleggende info), i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE SARS-CoV-2 Variant.
- 4) Fra nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) Fra nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
  - a. Merk: Settet kan brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), velg deretter "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 950 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren, velger du følgende konfigurasjon under "Custom Barcodes" (Egendefinerte strekkoder):
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Strekkode for Snap-In 2): la stå tom (ingen strekkodekonfigurasjon behøves for SARS-CoV-2 Variant reaction tube)
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Strekkode for Snap-In 3): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Strekkode for Snap-In 4): 1G hvis brukt i kombinasjon med SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (reaksjonsrør) og formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).
  - a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), "PCR Settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) skal fylles ut for posisjon 4 (blå) (se gjeldende bruksanvisning).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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

Tabell 3. PCR settings (PCR-innstillinger).

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

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

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0	
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	
	630/665	0,0	0,0	5,0	-	0,0	
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	

Tabell 4. Parametere for "Spectral Cross Talk" (spektral krysstale).

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

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Reverse transcription (Revers transkripsjon)	Vent	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling))	2 - Temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63°C	✓

Tabell 5. PCR-protokoll

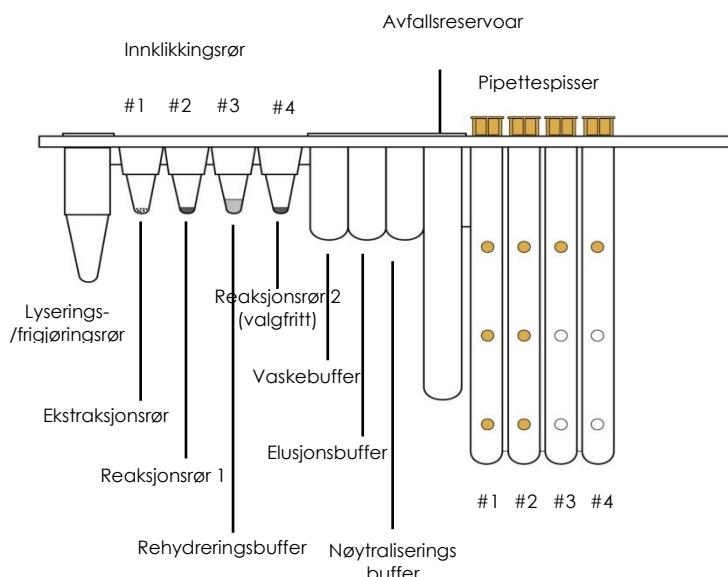
- 12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

### 8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- 1) Ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK TNA-3-settet for hver prøve som skal testes. Dunk forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørrene, og sett dem inn i BD MAX™ System prøvestativ.

- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (ekstraksjonsrør) (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk Extraction Tube(s) (ekstraksjonsrøret(ene)) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lylåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall SARS-CoV-2 Variant reaction tubes (grønn folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
  - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lylåsen.
  - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
  - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra SARS-CoV-2 reaction tubes (1G-folie hvis det gjelder VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lylåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (11-folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lylåsen.
  - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

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



### 8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™ System programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE SARS-CoV-2 Variant (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til "Sample Buffer Tube" (prøvebufferrøret) i vinduet "Sample Tube" (Prøverør) i "Work List" (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i "Work List" (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™ System (stativ A settes på venstre side av BD MAX™ System og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser nødvendig antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™ System.
- 9) Lukk døren på BD MAX™ System.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

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

## 9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan du analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™ System.

Analyse med VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er ment å bli utført som en bekreftelse av prøver med positivt resultat for RNA fra SARS-CoV-2. Ved bruk sammen med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System på prøver med ukjent status for tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2, referer til gjeldende bruksanvisninger for tolkning av resultater for fastslåelse av RNA fra SARS-CoV-2.

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

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

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

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

Sjekk det interne kontrollsigalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandinga fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™ System.

Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

Delesjon HV 69/70 (475/520) – mål	K417N mutasjonsmål (530/565)	K417T mutasjonsmål (585/630)	Endogen Intern kontroll (630/665)	Tolkning
+	-	-	+/- <sup>1</sup>	<b>Delesjon HV 69/70 Påvist<sup>1</sup></b>
-	+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>K417N mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
-	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>K417T mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
+	+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>Delesjon HV 69/70 og K417N-mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
+	-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>Delesjon HV 69/70 K417T-mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
-	+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>K417N- og K417T-mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
+	+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>Delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon og K417T- mutasjon Påvist<sup>1</sup></b>
-	-	-	+ <sup>1</sup>	<b>Delesjon HV 69/70 K417N-mutasjon og K417T- mutasjon ikke Påvist<sup>1</sup></b>
-	-	-	- <sup>2</sup>	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn. <sup>2</sup>
IND	IND	IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.

Tabell 6. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted.

-: Ingen amplifikasjon fant sted.

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

**2** Hvis målstedene for HV 69/70, K417N-mutasjon og K417T-mutasjon er negative, må IC vise et amplifikasjonssignal med Ct under 35. Fordi den endogene interne kontrollen er et housekeeping-gen som normalt skal finnes i alle humane nukleotide celler i den originale prøven, kan Ct-verdien variere veldig. Ved fravær av signal eller ved Ct-verdi  $\geq 35$  for den endogene interne kontrollen, anses resultatet som "Uavklart", og analysen må utføres på nytt.

Oppsummering av mutasjoner assosiert med følgende linjer til stede i de mest kjente bekymringsfulle variantene (Variants of Concern, VOC):

Linjer	WHO-merknad	Mutasjoner i S-genet		
		Delesjon HV 69/70	K417N-mutasjon	K417T-mutasjon
B.1.1.7	Alpha	X	-	-
B.1.351	Beta	-	X	-
P.1	Gamma	-	-	X

Tabell 7. Oppsummering av mutasjoner assosiert med kjente bekymringsfulle varianter (Variants of Concern, VOC).

<sup>1</sup><https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> (data frem til 19. mai 2021).

Andre varianter kan presentere delesjon HV 69/70 og mutasjoner K417T og K417N, da disse ikke er spesifikke for de nevnte variantene.

**Den endelige tildelingen til en linje må gjøres ved sekvensialisering.**

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen og gjennomgå ekstraksjonsprosessen som benyttes av brukeren; å bekrefte riktig bruk av hvert RT-qPCR-trinn og revidere parametriene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

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

## 10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler og spyttprøver, begge samlet inn i virustransportmedium (VTM).
- Det lyofiliserte produktet må være i bunnen av røret og ikke klebet til toppområdet eller folietetningen for en vellykket utførelse. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen har et stabilisert format – vanligvis lokalisert i bunnen av røret – og et utseende som er ulikt det vanlige utseendet (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større i størrelse og/eller har en annen farge enn hvitaktig), endrer ikke dette prøvens funksjonalitet.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra luftveisprøver.
- Testen er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målenivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduceres.

- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering avRNA fra SARS-CoV-2 med delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon eller K417T-mutasjon i S-genet, enten fra prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-RNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.
- De spesifikke kombinasjonene av primer og probe for påvisning av delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon eller K417T-mutasjon som benyttes i VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, viser ikke betydelige kombinerte homologier med det humane genomet, human mikroflora eller andre coronavirus, som kunne resultere i forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og kombinasjoner av disse faktorene, inkludert:
  - Feilaktig innsamling, transport, oppbevaring, og/eller håndtering av prøvematerialet.
  - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert RNA ekstraksjon).
  - Nedbrytning av viralt RNA gjennom transport/ oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
  - Mutasjon eller polymorfisme i primer eller probe bindingområder kan påvirke oppdagelsen av nye eller ukjente SARS-CoV-2 varianter.
  - Virusmengden i prøvematerialet er under grensen for påvisning i analysen.
  - Forekomst av RT-qPCR-hemmre eller andre typer forstyrrende substanser. Påvirkning fra vaksiner, antivirale legemidler, antibiotika, kjemoterapeutika og immunsuppressive legemidler brukt til å forhindre COVID-19 eller brukt til behandling av infeksjonen, har ikke blitt evaluert.
  - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- Noen prøver vil ikke vise amplifikasjonskurver for Rnase P på grunn av lav mengde humane celler i den opprinnelige kliniske prøven. Et negativt IC-signal utelukker ikke tilstedeværelse av delesjon HV 69/70, K417N-mutasjon eller K417T-mutasjon i en klinisk prøve.
- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis levedyktige virus og antyder ikke at virusene er infeksiøse eller er den bakenforliggende årsaken til kliniske symptomer. Men en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målets virussekvenser.
- Tilstedeværelsen av delesjon HV 69/70 assosieres med Alpha-varianten (linje B.1.1.7), K417N-mutasjon med Beta-variant (linje B.1.351) og K417T-mutasjon med Gamma-variant (linje P.1).
- Negative resultater utelukker ikke tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2 da denne analysen er ment for bruk med prøver som er positive for SARS-CoV-2.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

## 11. Kvalitetskontroll

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

## 12. Ytelsesegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble testet med kliniske luftveisprøver (nasefaryngeale prøvepensler) fra pasienter med mistanke om luftveisinfeksjon. Resultatene var som følger:

	<b>Sted</b>	<b>Prøvetype</b>	<b>Arbeidsflyt</b>	<b>Mål</b>
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spania)	nasofaryngeal prøvepensel	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Delesjon HV 69/70
				Mutasjon K417T
				Mutasjon K417N

Tabell 8. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Sanne positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, samt verdier for sensitivitet og spesifisitet for VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble regnet ut i forhold til hver komparatoranalyse som vist i tabellen nedenfor:

<b>Sted</b>	<b>Komparatoranalyse</b>	<b>Mål</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensitivitet</b>	<b>Spesifisitet</b>
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit for molekylær analyse og sekvensering	Delesjon HV 69/70	48	167	0	2	96% (85–99)	100 % (97–100)
		Mutasjon K417T	50	167	0	0	100 % (91–100)	100 % (97–100)
		Mutasjon K417N	7	209	0	1	88% (46–99)	100 % (97–100)

Tabell 9. Sanne positive (TP) og negative (TN) verdier, falske positive (FP) og negative (FN) verdier, sensitivitet og spesifisitet for VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Resultater viser overensstemmelse for påvisning av delesjon HV 69/70, K417T- og K417N-mutasjoner i SARS-CoV-2 ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

For å kunne evaluere kompatibilitet av forskjellige prøvematriser (nasofaryngeal prøvepensel, orofaryngeal prøvepensel og nasofaryngeal/orofaryngeal prøvepensel i virustransportmedium (VTM) fra Vircell) ble det utført en kompatibilitetsstudie. Resultatene oppnådd viste at de tre forskjellige prøvematrismene var kompatible med VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

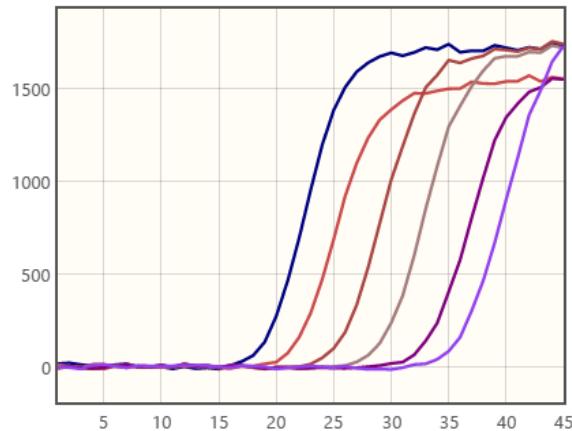
### 12.2. Analytisk sensitivitet

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System påvisningsgrense (LoD) resultater med en positiv andel på  $\geq 95\%$  er som følger:

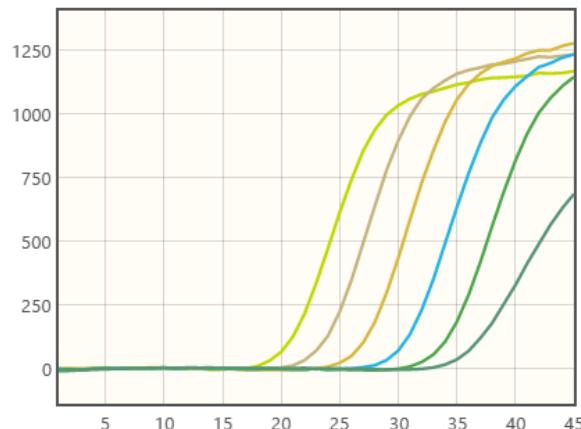
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrense (LoD) på  $\geq 2$  genomkopier/reaksjon på nasofaryngeale prøver og  $\geq 5$  genomkopier/reaksjon på spyttprøver for delesjon HV 69/70 målt med SARS-CoV-2 B.1.1.7-linjen.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrense (LoD) på  $\geq 5$  genomkopier/reaksjon på nasofaryngeale prøver og  $\geq 5$  genomkopier/reaksjon på spyttprøver for K417N-mutasjon, målt med SARS-CoV-2 B.1.351-linjen.

- c) VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrad (LoD) på  $\geq 10$  genomkopier/reaksjon på nasofaryngeale prøver og  $\geq 15$  genomkopier/reaksjon på spytprøver for K417T-mutasjon, målt med SARS-CoV-2 P.1-linjen.

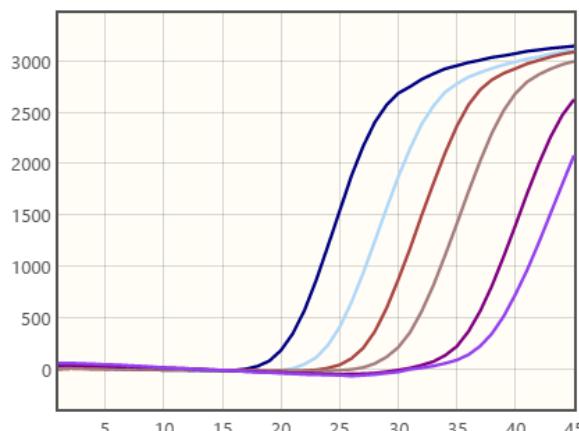
Figur 2. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 Variant (delesjon HV 69/70) (syntetisk cDNA) ( $5,3 \cdot 10^5 - 5,2 \cdot 10^1$  genomkopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).



Figur 3. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 Variant (K417N-mutasjon) (syntetisk cDNA) ( $5,3 \cdot 10^5 - 5,2 \cdot 10^1$  genomkopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 530/565 (HEX)).



Figur 4. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 Variant (K417T-mutasjon) ( $5,3 \cdot 10^5 - 5,2 \cdot 10^1$  genomkopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 585/630 (ROX)).



## 12.3. Analytisk spesifisitet

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

Test av kryssreakтивitet					
Humant adenovirus, type 1–5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influensavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Influensavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influensavirus A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Humant parainfluensavirus 1, 2, 3 og 4	-
Bordetella holmesii	-	Influensavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 og g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Influensavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Humant rhinovirus	-
Bordetella pertussis	-	Influensavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)	-	Respiratorisk syncytialt virus (RSV) A/B	-
Chlamydia caviae	-	Influensavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	SARS Coronavirus stamme Frankfurt 1	-
Chlamydia psittaci genotype A og C	-	Influensavirus B/Brisbane/60/2008	-	Human 2019-nCoV-stammen BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influensavirus A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Human 2019-nCoV-stammen 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 og HKU1	-	Influensavirus B/Phuket/3073/2013	-	MT007544.1 (SARS-CoV-2 isolat Australia/VIC01/2020)*	-
MERS Coronavirus	-	Influensavirus B/Florida/04/06	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolat Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 og B3	-	Legionella bozemanii	-	SARS-CoV-2-stammen 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*	-
Influensavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus	-
Influensavirus A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Humant metapneumovirus A og B	-	Streptococcus pneumoniae	-
Influensavirus A/California/7/2009(H1N1) pdm09 virus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes	-

Tabell 10. Patogene mikroorganismer benyttet som referanse i denne studien.

\* Merk at påvisning av disse SARS-CoV-2-stammene ikke er tatt med i betrakting i denne analysen. Denne testen er designet for kvalitativ deteksjon av delesjonHV 69/70 deletion, K417N-mutasjon og K417T-mutasjon i S-genet til stede i SARS-CoV-2 Alpha, Beta og Gamma-variantene (linjer B.1.1.7, B.1.351 og P.1); ; blant qndre.

## 12.4. Analytisk reaktivitet

Reaktiviteten til VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble evaluert mot syntetiske RNA-kontroller for to forskjellige sekvenser assosiert med Alpha-varianten (B.1.1.7\_710528 UK-varianten og B.1.1.7\_601443 UK-varianten), en sekvens assosiert med Beta-varianten (kontroll 16, SARS-CoV-2 linje B.1.351 Sør-Afrika/KRISP-ECK005299/2020) og en sekvens assosiert med Gamma-varianten (kontroll 17, SARS-CoV-2 linje P.1 Japansk/Brasiliansk variant Japan/IC-0564/2021), med positive resultater.

## Bibliography/ Bibliografi

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/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/i/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/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

<b>IVD</b>	In vitro diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet		Keep dry Holdes tørr		Use by Brukes innen		Manufacturer Produsent	<b>LOT</b>	Batch code (Lot) Partikode (lot)
	Consult instructions for use Les bruksanvisningen		Temperature limitation Temperaturgr enser		Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester	DIL	Sample diluent Prøvediluent	<b>REF</b>	Catalognumber Katalognummer

## Trademarks

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

<b>Change Control / Endringskontroll</b>		
<b>Version No. / Versjon nr.</b>	<b>Changes / Endringer</b>	<b>Date / Dato</b>
00	Original version / Original versjon.	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. / Nye mål inkludert i produktdesignet. Endring av variantenes navn for å møte WHO-kriteriene for navngivning av SARS-CoV-2-variantene.	10/08/2021

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

Revision: 10<sup>th</sup> 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](mailto:certest@certest.es) | [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es)

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

One step ahead



F-566 rev01

