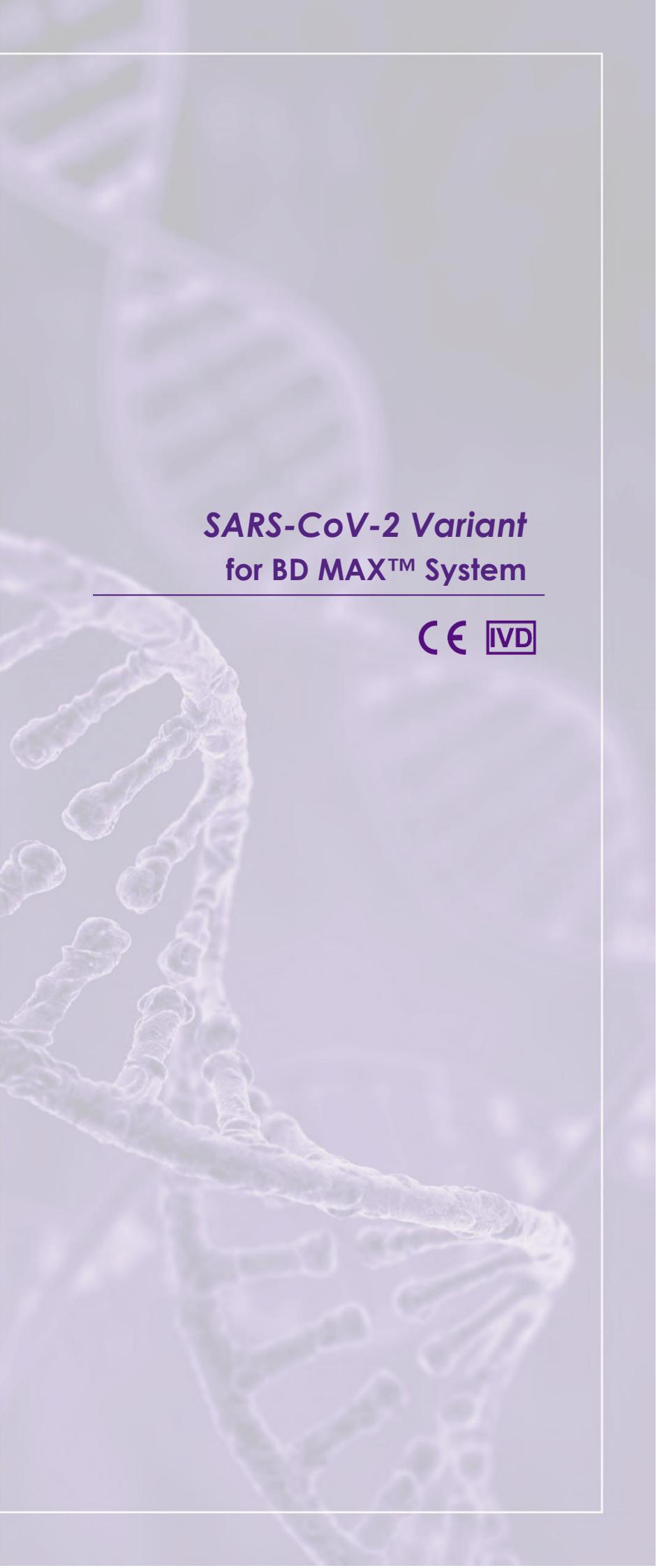




VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



SARS-CoV-2 Variant
for BD MAX™ System

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência do produto a usar com o 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

Índice

1.	Utilização prevista	22
2.	Introdução e explicação	22
3.	Princípio do procedimento	24
4.	Reagentes fornecidos	25
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	25
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	25
7.	Precauções para o utilizador.....	25
8.	Procedimento do teste	27
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	27
8.2.	Preparação da amostra e extração de ARN	28
8.3.	Protocolo de PCR.....	28

9.	Interpretação dos resultados.....	32
10.	Limitações do teste.....	34
11.	Controlo de qualidade	35
12.	Características do teste	36
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	36
12.2.	Sensibilidade analítica.....	36
12.3.	Especificidade analítica.....	38
12.4.	Reatividade analítica.....	39
	Bibliography/ Bibliografia	40
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	41
	Trademarks.....	41

ENGLISH

1. Intended use

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

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

This test is intended to be used as an aid to monitor the prevalence of variants that carry the HV 69/70 deletion, K417N or K417T mutations in the S gene and to assist in control measures. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for HV 69/70 deletion, K417N or K417T mutations.

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) and saliva specimens collected mainly by a healthcare professional) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the identification of SARS-CoV-2 [11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [11,12].

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

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

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

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA with HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation in the S gene of SARS-CoV-2 from nasopharyngeal and oropharyngeal swabs and saliva samples. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase, which is followed by the amplification of a conserved region of S gene for SARS-CoV-2 for HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation using specific primers and fluorescent-labeled probes.

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

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

Target	Channel	Gene
HV 69/70 deletion	475/520	S gene
K417N mutation	530/565	S gene
K417T mutation	585/630	S gene
Endogenous Internal Control (IC)	630/665	human RNase P gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-USB124 (444216).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Optional: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215)

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.

- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- If the kit is used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), please refer to the corresponding instructions for use.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs and saliva samples, both collected in viral transport medium (VTM) – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD - or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) -Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd and oropharyngeal swabs collected in viral transport medium (VTM) - Vircell. Other types of samples must be validated by the user.

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

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

8.2. Sample preparation and RNA extraction

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

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

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

In case of using saliva samples collected in transport media:

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

Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

In case of using neat saliva samples:

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

8.3. PCR protocol

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

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

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

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 Variant.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: leave empty (concerning SARS-CoV-2 Variant reaction tube no barcode configuration is needed).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G if used in combination with SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube and the format "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).

- a. Note: Product may be used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 4 (blue) position (see the corresponding instructions for use).

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

Table 3. PCR settings.

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

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

	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.

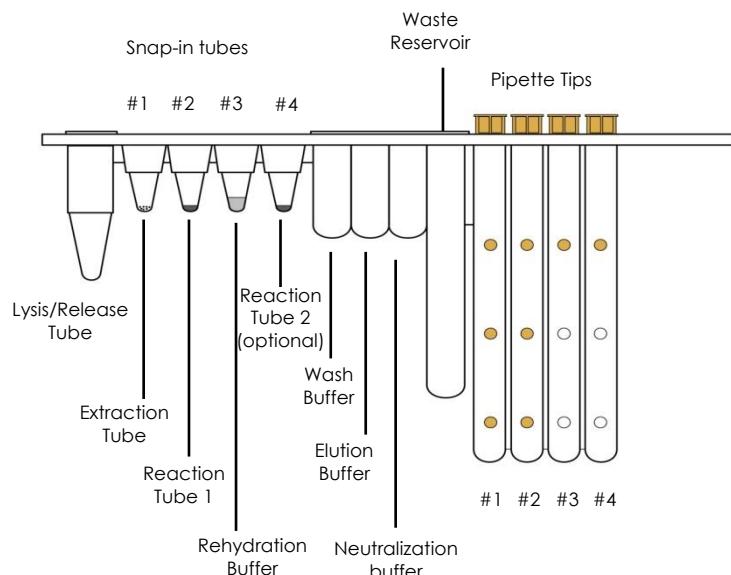
- 12) Click the "Save Test" button.

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
+	-	-	+/- ¹	HV 69/70 deletion Detected¹
-	+	-	+/- ¹	K417N mutation Detected¹
-	-	+	+/- ¹	K417T mutation Detected¹
+	+	-	+/- ¹	HV 69/70 deletion and K417N mutation Detected¹
+	-	+	+/- ¹	HV 69/70 deletion and K417T mutation Detected¹
-	+	+	+/- ¹	K417N and K417T mutation Detected¹
+	+	+	+/- ¹	HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation Detected¹
-	-	-	+ ¹	HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation not Detected¹
-	-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs. ²
IND	IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

2 In the case of HV 69/70 deletion, K417N mutation and K417T mutation targets sites negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Endogenous Internal Control, the result is considered as 'Unresolved', and retesting is required.

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

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

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

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

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

Final assignment to a lineage must be done by sequencing.

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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and saliva samples, all collected in Viral Transport Medium (VTM).
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2 RNA with HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation in the S gene, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation used in VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other coronaviruses, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).

- Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
- Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2 variant.
- A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
- The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples may fail to exhibit RNase P amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of HV 69/70 deletion, K417N mutation or K417T mutation in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences.
- The presence of the HV 69/70 deletion is associated with the Alpha variant (lineage B.1.1.7), K417N mutation with Beta variant (lineage B.1.351) and K417T mutation with Gamma variant (lineage P.1), however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.
- Negative results do not preclude presence of SARS-CoV-2 RNA due to this assay is intended to be used with positive SARS-CoV-2 samples.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

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

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

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

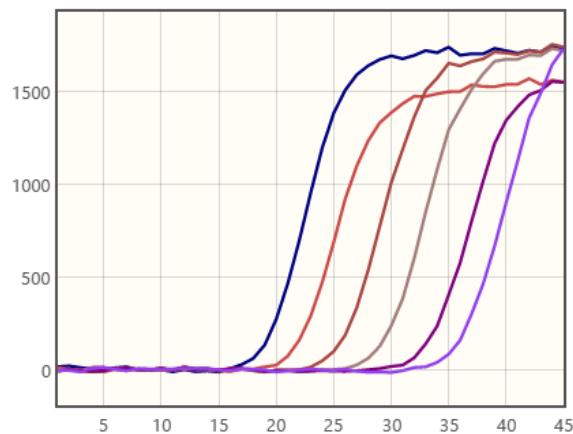


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417N mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

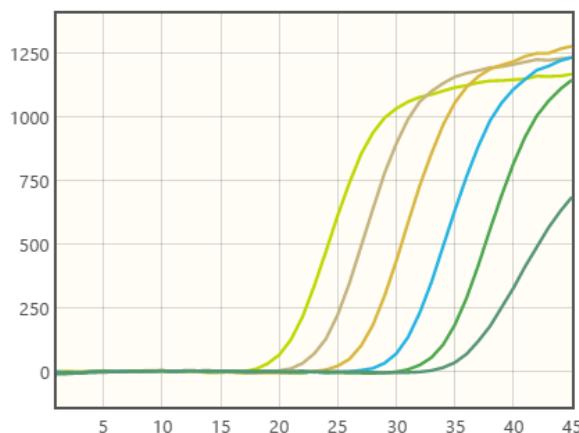
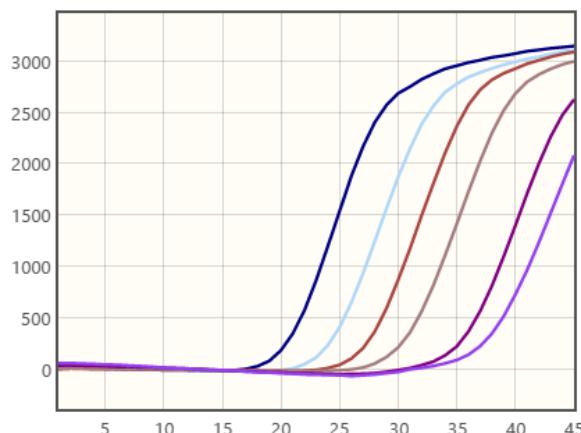


Figure 4. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417T mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



12.3. Analytical specificity

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

Cross-reactivity testing				
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	Mycoplasma pneumoniae
Bocavirus	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Mycobacterium tuberculosis
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 and g885652
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human rhinovirus
Bordetella pertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A/B
Chlamydia caviae	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1*
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	MT007544.1(SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020)*
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)*
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	Legionella bozemani	-	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA WA1/2020*
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella dumoffii	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*
Enterovirus 68, 71	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Human metapneumovirus A and B	-	Streptococcus pneumoniae
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09 virus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

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

12.4. Analytical reactivity

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

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System é um teste automatizado de RT-PCR em tempo real, concebido para a deteção qualitativa da deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T no gene S do SARS-CoV-2, associado às variantes Alfa (linhagem B.1.1.7), Beta (linhagem B.1.351) e Gama (linhagem P.1) do SARS-CoV-2, em esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos e amostras de saliva.

O ensaio destina-se a ser utilizado com amostras positivas para SARS-CoV-2 ou, quando o teste é realizado em conjunto com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) com amostras de doentes com suspeita de doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) pelo seu profissional saúde (PS).

O teste destina-se a ser utilizado como auxiliar na monitorização da prevalência de variantes que transportam a deleção HV 69/70 e mutações K417N ou K417T no gene S e para auxiliar nas medidas de controlo. O ensaio utiliza o BD MAX™ System para levar a cabo a extração automática de ARN e subsequente RT-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com reagentes universais e descartáveis para o BD MAX™ System. O ARN é extraído das amostras e o ADN complementar (ADNc) é sintetizado e amplificado utilizando RT-PCR e detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para a deleção HV 69/70 e as mutações K417N ou K417T.

2. Introdução e explicação

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

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

A transmissão entre humanos do SARS-CoV-2 foi confirmada, mesmo no período de incubação sem sintomas, e o vírus provoca doença respiratória grave, como a causada pelo SARS-CoV [1,6,7,8]. Embora a pneumonia seja a principal doença associada, alguns doentes desenvolveram pneumonia grave, edema pulmonar, síndrome de insuficiência respiratória aguda, ou falência de múltiplos órgãos e morte [1,4]. Os Centros de Prevenção e Controlo de Doenças (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) consideram que os sintomas do SARS-CoV-2 podem surgir logo ao fim de 2 dias ou apenas ao fim de 14 dias após a exposição, sendo os mais frequentes febre ou arrepios, tosse, fadiga, anorexia, miose e dispneia [1,4,6,9]. Dores de garganta, congestão nasal, cefaleias, diarreia, náuseas e vômitos constituem sintomas menos frequentes [1,4]. Também foram relatados sintomas como

perda de olfato (anosmia) ou perda de paladar (ageusia) que precedem o início dos sintomas respiratórios [9]. Adultos mais velhos e pessoas com condições médicas preexistentes graves como doença cardíaca ou pulmonar, ou diabetes, parecem apresentar um risco mais elevado de desenvolver complicações mais graves da doença COVID-19 [10].

O diagnóstico de COVID-19 é realizado detetando causas convencionais de pneumonia precoce e por sequenciação de próxima geração ou por métodos de RT-PCR em tempo real [1,11]. Estão atualmente disponíveis vários ensaios que detetam o SARS-CoV-2, como o do CDC chinês (genes-alvo, ORF1ab e N), Charité – Alemanha (genes-alvo, RdRP e E) ou o do CDC dos EUA (dois alvos no gene N) [12].

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

Desde a caracterização genómica inicial do SARS-CoV-2, o vírus foi dividido em grupos ou agrupamentos genéticos diferentes (S, L, V, G com subgrupos GH e GR). O aparecimento de mutações é um acontecimento natural e esperado dentro do processo evolutivo do vírus. De facto, algumas mutações específicas definem os grupos genéticos virais que estão atualmente em circulação a nível mundial. As mutações identificadas até à data permanecem dentro dos padrões esperados para um coronavírus. Os vírus classificados no grupo genético C são os mais frequentes no mundo inteiro. Graças à sequenciação genética do agente patogénico a nível mundial, foi possível estabelecer padrões de dispersão e evolução do vírus.

A 14 de dezembro de 2020, o Reino Unido declarou um aumento da incidência de SARS-CoV-2 em algumas regiões do país, associada a uma nova variante do vírus supostamente com uma maior capacidade de transmissão. Esta variante, chamada variante Alfa (B.1.1.7) apresentava 23 mutações diferentes: 13 não sinónimas, incluindo uma série de mutações na proteína da espícula (s), 4 deleções e 6 sinónimas. No final de dezembro, esta variante tinha sido detetada em 31 países e territórios em 5 das 6 regiões da OMS. Uma das mutações é a deleção nas posições 69-70 na proteína da espícula. A deteção da deleção HV 69/70 é de suma importância dado que foi associada a fuga imunológica em doentes imunossuprimidos e a um aumento da infetividade viral. Outro motivo de preocupação em relação à deleção HV 69/70 é que esta afeta a sensibilidade de deteção do vírus utilizando técnicas moleculares (RT-PCR) que detetam o gene S.

A presença da deleção HV 69/70 está associada à variante Alfa, linhagem B.1.1.7, no entanto, outras variantes como a B.1.1.298 (linhagem dinamarquesa) ou B.1.258 também apresentam esta deleção.

A variante Beta (B.1.351) foi identificada pela primeira vez em Nelson Mandela Bay, África do Sul, em amostras que datavam do início de outubro de 2020. A variante também foi identificada na Zâmbia no final de dezembro de 2020, altura em que parecia ser a variante predominante no país. Esta variante tem múltiplas mutações na proteína da espícula, incluindo K417N, E484K, N501Y. Demonstrou uma potencial redução na neutralização com alguns tratamentos à base de anticorpos monoclonais nos EUA.

A epidemia de SARS-CoV-2 no Brasil foi dominada por duas linhagens designadas P.1 e P.2, com mutações no domínio de ligação do recetor da proteína da espícula (S). A linhagem P.1 (denominada de Gama) é considerada

uma Variante de Preocupação (Variant of Concern - VOC) porque apresenta potencial redução na neutralização com alguns tratamentos à base de anticorpos monoclonais nos EUA. Esta linhagem apresenta múltiplas mutações na proteína S (incluindo K417T, E484K, N501Y) e o seu aparecimento foi associado a uma segunda vaga epidémica de COVID-19 no estado do Amazonas. A linhagem P.2 é considerada uma Variante sob Monitorização (Variant Under Monitoring - VUM) e alberga apenas a mutação E484K. A linhagem P.2 foi detetada como a variante mais prevalente em várias regiões do estado do Amazonas em todo o país, no fim de 2020 e início de 2021.

O aparecimento de variantes que aumentam a transmissibilidade do vírus, a sua virulência ou que escapam à ação de anticorpos neutralizadores gerados após infecção natural ou após a vacina, constitui um problema de saúde pública de primeira ordem, que pode ter um impacto importante no controlo da pandemia. Por esta razão, o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System permite a deteção da deleção HV 69/70 e das mutações K417N ou K417T associadas com as Variantes de Preocupação Alfa, Beta e Gama.

3. Princípio do procedimento

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a deteção qualitativa de ARN com deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T no gene S do SARS-CoV-2 em esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos e amostras de saliva. A deteção realiza-se através de um formato RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. O ARN-alvo isolado é transcrito gerando ADN complementar por transcriptase reversa, seguindo-se a amplificação de uma região conservada do gene S do SARS-CoV-2 para a deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com fluorescência.

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

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

Alvo	Canal	Gene
Deleção HV 69/70	475/520	Gene S
Mutação K417N	530/565	Gene S
Mutação K417T	585/630	Gene S
Controlo interno (CI) endógeno	630/665	Gene RNase P humano

Tabela 1. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

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

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

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com o N.º Ref.^a VS-USB124 (444216).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

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

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref.^a: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref.^a: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.
- Opcional: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.^a: 444215)

6. Condições de transporte e armazenamento

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

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais de saúde e técnicos de laboratório, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.

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

(CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.

- Em conclusão, as amostras de saliva revelaram-se compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. (Ref: 444215); consulte as instruções de utilização correspondentes.
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em esfregaços nasofaríngeos e amostras de saliva colhidos em meio de transporte viral (MTV) – Vircell S.L. -; meios BD™ Universal Viral Transport (UVT) System – BD - ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) - Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, e esfregaços orofaríngeos colhidos em meio de transporte viral (MTV) - Vircell. Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

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

Os esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e as amostras de saliva têm de ser colhidos, transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) e as orientações da IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Preparação da amostra e extração de ARN

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

Quando utilizar amostras nasofaríngeas e/ou orofaríngeas:

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

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

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

No caso de utilizar amostras de saliva puras:

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

8.3. Protocolo de PCR

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

8.3.1. Programação do teste PCR para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

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

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador de informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE SARS-CoV-2 Variant.

- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.º: 444215), em seguida selecionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)).
- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior, em "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): deixar vazio (relativamente ao tubo de reação de SARS-CoV-2 Variant reaction tube não é necessária nenhuma configuração de código de barras).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 4): 1G se utilizado em combinação com o tubo de reação SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube e o formato "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.º: 444215); neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para a posição de encaixe 4 (azul) (consultar as instruções de utilização correspondentes).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
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

Tabela 3. "PCR Settings" (Definições de PCR).

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

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

	Channel (Canal)	False Receiving Channel (Canal receptor falso)				
		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	5,0	-	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-

Tabela 4. Parâmetros de “Spectral Cross Talk” (interação espectral).

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

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo(s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Reverse transcription (Transcrição reversa)	Retenção	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/extensão(recolha de dados))	2- Temperatura	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabela 5. Protocolo de PCR.

- 12) Clicar no botão “Save Test” (Guardar teste).

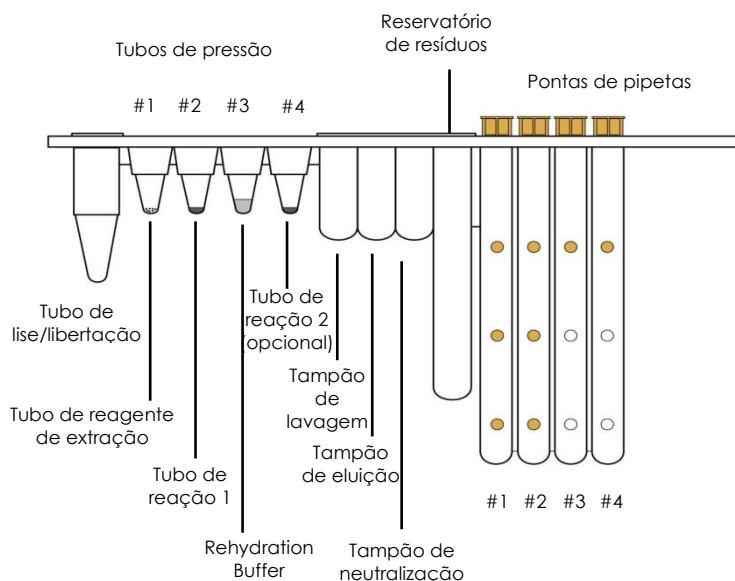
8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- Determinar e separar o número adequado de tubos de reação SARS-CoV-2 Variant reaction tube (selo verde) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver Figura 1).
 - Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada

tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.

- i. Nota: Se escolher o formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla lyofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes SARS-CoV-2 adicionais (selo 1G no caso do teste VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2)) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição de encaixe 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
- a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

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



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Work List" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu de lista pendente "Test" (Teste), selecionar VIASURE SARS-CoV-2 Variant (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.

- 4) Introduzir o número de identificação do "Sample Buffer Tube" (tubo de tampão de amostra) na janela "Sample tube" (Tubo de amostra) no separador "Work List" (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de introdução manual.
- 5) Preencher a janela "Specimen/Patient ID" (ID de amostra/doente) e "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra (Sample Buffer Tubes). Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os Sample Buffer Tube estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra (Sample Buffer Tube) preparado no(s) BD MAX™ Rack(s) (suportes para tubos do BD MAX™ System).
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

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

9. Interpretação dos resultados

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

A análise do VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System destina-se a ser realizada como um reflexo em amostras com resultado positivo para ARN do SARS-CoV-2. Se utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System em amostras com estado desconhecido para a presença de ARN do SARS-CoV-2, consultar interpretação de resultados nas instruções de utilização para a determinação correta de ARN do SARS-CoV-2.

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

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

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

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

Alvo da deleção HV 69/70 (475/520)	Alvo da mutação K417N (530/565)	Alvo da mutação K417T (585/630)	Controlo interno endógeno (630/665)	Interpretação
+	-	-	+/- ¹	Deleção HV 69/70 detetada¹
-	+	-	+/- ¹	Mutação K417N detetada¹
-	-	+	+/- ¹	Mutação K417T detetada¹
+	+	-	+/- ¹	Deleção HV 69/70 e mutação K417N detetadas¹
+	-	+	+/- ¹	Deleção HV 69/70 e mutação K417T detetadas¹
-	+	+	+/- ¹	Mutação K417N e mutação K417T detetadas¹
+	+	+	+/- ¹	Deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T detetadas¹
-	-	-	+ ¹	Deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T não detetadas¹
-	-	-	- ²	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ²
IND	IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 6. Interpretação da amostra.

+: Houve amplificação.

+: Não houve amplificação.

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

2 No caso de locais-alvo negativos para deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T, o CI deve mostrar um sinal de amplificação com Ct inferior a 35. O valor Ct pode ser muito variável devido ao controlo interno endógeno ser um gene de manutenção humano que deve estar presente em todas as células humanas nucleadas na amostra original. Se houver ausência de sinal ou o valor CT for ≥ 35 do controlo interno endógeno, o resultado é considerado "não resolvido" e é necessário repetir o teste.

Resumo de mutações associadas com as seguintes linhagens presentes nas Variantes de Preocupação (VOC) mais conhecidas:

Linhagens	Identificação OMS	Mutações no gene S ¹		
		Deleção HV 69/70	Mutação K417N	Mutação K417T
B.1.1.7	Alfa	X	-	-
B.1.351	Beta	-	X	-
P.1	Gama	-	-	X

Tabela 7. Resumo de mutações associadas a Variantes de Preocupação (VOC) conhecidas.

¹<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> (dados até 19 de maio de 2021).

Outras variantes podem apresentar a deleção HV 69/70 e as mutações K417T e K417N porque não são específicas das variantes mencionadas.

A atribuição final a uma linhagem tem de ser feita mediante sequenciação.

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

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

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado com esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e amostras de saliva colhidos em meio de transporte viral (MTV).
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Pode-se detetar um baixo número de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada com ARN do SARS-CoV-2 com a deleção HV 69/70, a mutação K417N ou a mutação K417T, quer por amostras que contêm elevadas concentrações de ARN alvo quer pela contaminação devida a produtos de PCR de reacções anteriores.

- As combinações de oligonucleótidos e sondas específicas para deteção da deleção HV 69/70, mutação K417N ou mutação K417T utilizadas no VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, não apresentam homologias combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana, ou outros coronavírus, o que pode resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ARN).
 - Degradação do ARN viral durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas do SARS-CoV-2.
 - Uma carga viral no espécime abaixo do limite de deteção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores utilizados para prevenir a COVID-19 ou utilizados durante o tratamento da infecção.
 - A não observância das instruções e do procedimento do ensaio.
- Algumas amostras podem não conseguir exibir curvas de amplificação de RNase P devido a um número baixo de células humanas na amostra clínica original. Um sinal de CI negativo não exclui a presença da deleção HV 69/70, mutação K417N ou mutação K417T num espécime clínico.
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de vírus viáveis e não significa que estes vírus são infeciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. Contudo, um resultado positivo é indicador da presença de sequências virais alvos.
- A presença da deleção HV 69/70 está associada com a variante Alfa (linhagem B.1.1.7), a presença da mutação K417N com a variante Beta (linhagem B.1.351) e a presença da mutação K417T com a variante Gama (linhagem P.1), contudo, a atribuição final de uma linhagem tem de ser feita mediante sequenciação.
- Os resultados negativos não excluem a presença de ARN do SARS-CoV-2 devido ao facto de este ensaio ter sido concebido para utilização em amostras positivas para o SARS-CoV-2.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, com o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, será necessário repetir o teste. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

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

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras clínicas respiratórias (esfregaços nasofaríngeos) de doentes com suspeita de infecção respiratória. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Espanha)	esfregaço nasofaríngeo	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Deleção HV 69/70 Mutação K417T Mutação K417N

Tabela 8. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

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

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
1	Ensaio molecular + sequenciação com TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	Deleção HV 69/70	48	167	0	2	96% (85 – 99)	100% (97 – 100)
		Mutação K417T	50	167	0	0	100% (91 – 100)	100% (97 – 100)
		Mutação K417N	7	209	0	1	88% (46 – 99)	100% (97 – 100)

Tabela 9. Valores positivos (TP) e negativos (TN) verdadeiros, valores positivos (FP) e negativos (FN) falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

O resultado mostra concordância para detetar a deleção HV 69/70, mutação K417N e mutação K417T no SARS-CoV-2 utilizando o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

De modo a avaliar a compatibilidade de diferentes matrizes de amostra (esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo e esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo em meio de transporte viral (MTV) da Vircell), foi realizado um estudo de compatibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que as três diferentes matrizes de amostra eram compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

Os resultados obtidos a calcular o limite de deteção (LD) de VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, com uma taxa positiva de $\geq 95\%$, são os seguintes:

- O VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção (LD) ≥ 2 cópias de genoma/reacção em amostras nasofaríngeas e ≥ 5 cópias de genoma/reacção em amostras de saliva para a deleção HV 69/70 medida utilizando a linhagem B.1.1.7 do SARS-CoV-2.
- O VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção (LD) ≥ 5 cópias de genoma/reacção em amostras nasofaríngeas e ≥ 5 cópias de genoma/reacção em

amostras de saliva para a deleção mutação K417N medida utilizando a linhagem B.1.351 do SARS-CoV-2.

- c) O VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção (LD) ≥ 10 cópias de genoma/reAÇÃO em amostras nasofaríngeas e ≥ 15 cópias de genoma/reAÇÃO em amostras de saliva para a deleção mutação K417T medida utilizando a linhagem P.1 do SARS-CoV-2.

Figura 2 Diluições em série de um modelo de variante do SARS-CoV-2 (deleção HV 69/70) (ADNc sintético) ($5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ cópias de genoma por reAÇÃO) no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

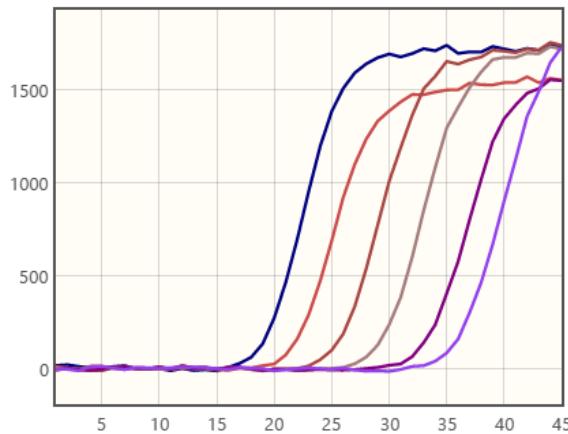


Figura 3 Diluições em série de um modelo de variante do SARS-CoV-2 (mutação K417N) (ADNc sintético) ($5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ cópias de genoma por reAÇÃO) no BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

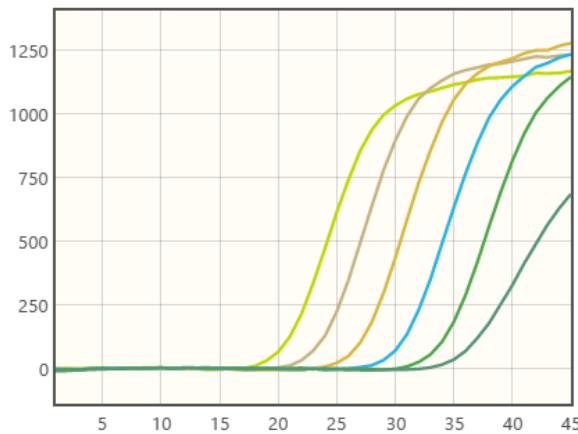
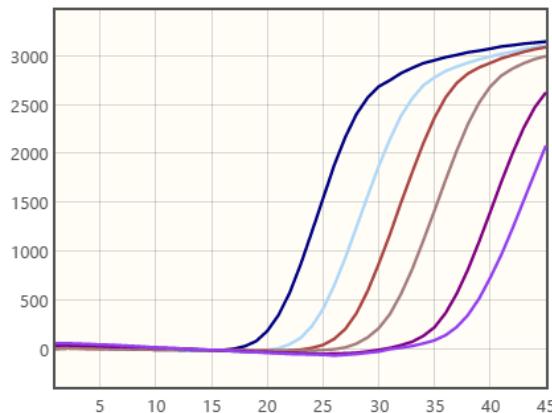


Figura 4 Diluições em série de um modelo de variante do SARS-CoV-2 (mutação K417T) (ADNc sintético) ($5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ cópias de genoma por reAÇÃO) no BD MAX™ System (canal 585/630 (ROX)).



12.3. Especificidade analítica

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

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Mycoplasma pneumoniae	-
Bocavirus	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-
Bordetella bronchiseptica	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
Bordetella holmesii	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 e g885652	-
Bordetella parapertussis	-	Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Rinovírus humano	-
Bordetella pertussis	-	Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)	-	Vírus sincicial respiratório (RSV) A/B	-
Chlamydia caviae	-	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-
Chlamydia psittaci genótipo A e C	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	2019-nCoV humano, estirpe BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	2019-nCoV humano, estirpe 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	MT007544.1 (isolado de SARS-CoV-2 Australia/VIC01/2020)	-
Coronavírus MERS	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	MN908947.3 (isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovírus Coxsackievirus A24, A9 e B3	-	Legionella bozemanii	-	SARS-CoV-2, estirpe 2019nCoV/USAWA1/2020*	-
Enterovírus Echovirus 30	-	Legionella dumoffii	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*	-
Enterovírus 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*	-
Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus	-
Vírus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Metapneumovírus A e B humano	-	Streptococcus pneumoniae	-
Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09-like	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes	-

Tabela 10. Microrganismos e agentes patogénicos de referência utilizados neste estudo.

* Tenha em atenção que a deteção destas estirpes do SARS-CoV-2 não é considerada neste ensaio. Este teste é concebido para a deteção qualitativa da deleção HV 69/70, da mutação K417N e da mutação K417T no gene S presente nas variantes do SARS-CoV-2 Alfa, Beta e Gama (linhagens B.1.1.7, B.1.351 e P.1), entre outras.

12.4. Reatividade analítica

A reatividade do VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi avaliada contra controlos de ARN sintéticos para duas sequências diferentes associadas à variante Alfa (variante B.1.1.7_710528 UK e B.1.1.7_601443 UK), uma sequência associada à variante Beta (Controlo 16, SARS-CoV-2 linhagem B.1.351 - South Africa/KRISP-ECK005299/2020) e uma sequência associada à variante Gama (Controlo 17, SARS-CoV-2 linhagem P.1 variante Japonesa/Brasileira Japan/IC-0564/2021), tendo revelado um resultado positivo.

Bibliography/ Bibliografia

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed January 2021.
4. Chen N. et al. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-CoV-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed January 2021.
7. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed January 2021.
10. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed January 2021.
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed January 2021.
12. Yan Y et al. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed January 2021.
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed January 2021.
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.

18. McBride R. et al. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. et al. Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.
20. World Health Organization. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance Interim guidance. 21 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/item/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance> Accessed January 2021.
21. Enfermedad por coronavirus, COVID-19, Información Científica-técnica. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, España. 01-2021.
22. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Emerging SARS-CoV-2 Variants. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html> Accessed May 2021
23. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html> Accessed May 2021.
24. Brief report: New Variant Strain of SARS-CoV-2 Identified in Travelers from Brazil (NIID, Japan) Available from <https://www.niid.go.jp/niid/en/2019-ncov-e/10108-covid19-33-en.html> Accessed May 2021.
25. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. Available from <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586> Accessed May 2021.
26. Tegally H et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. medRxiv 2020; doi: 10.1101/2020.12.21.20248640

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

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

Trademarks

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

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º	Changes / Alterações	Date / Data
00	Original version / Versão original.	13/08/2021

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

Revision: 13th August 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01