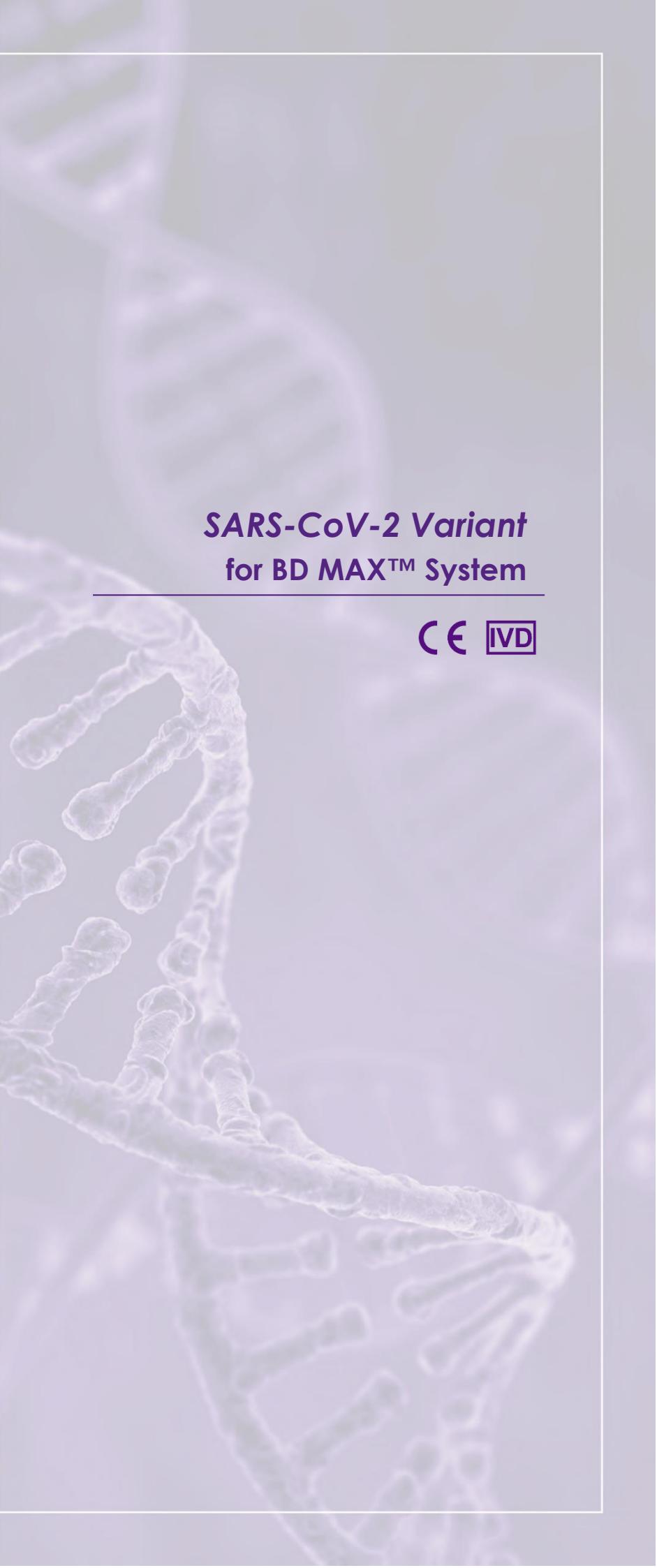




VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



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

CE IVD

These instructions for use apply to the following reference / Bu kullanım talimatları aşağıdaki referans için geçerlidir:

PRODUCT / ÜRÜN	REFERENCE / REFERANS
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. / BD MAX™ System ile kullanılacak ürün için referans.

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

İçerik

1.	Kullanım amacı.....	22
2.	Özet ve Açıklama.....	22
3.	Prosedür ilkesi.....	24
4.	Verilen reaktifler	24
5.	Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman	25
6.	Taşıma ve depolama koşulları	25
7.	Kullanıcılara uyarılar	25
8.	Test prosedürü.....	26
8.1.	Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması	26
8.2.	Numunelerin hazırlanması ve RNA ekstraksiyonu	27
8.3.	PCR protokolü.....	28

9.	Sonuçların yorumlanması	31
10.	Testin kısıtlamaları	33
11.	Kalite kontrol	34
12.	Performans özellikleri.....	35
12.1.	Klinik duyarlılık ve özgürlük	35
12.2.	Analitik hassasiyet.....	35
12.3.	Analitik özgürlük	37
12.4.	Analitik reaktivite	38
	Bibliography/ Bibliyografyay	39
	Symbols for IVD components and reagents/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembollerİ	40
	Trademarks.....	40

ENGLISH

1. Intended use

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

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

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

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Principle of the procedure

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

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

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

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

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

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

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

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

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

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

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

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

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

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

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

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

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

8.2. Sample preparation and RNA extraction

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

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

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

In case of using saliva samples collected in transport media:

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

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

In case of using neat saliva samples:

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

8.3. PCR protocol

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

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

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

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

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

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

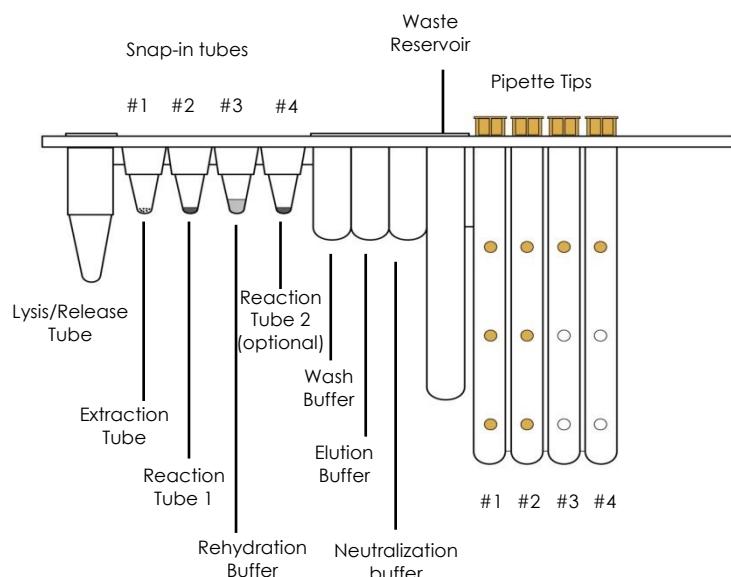
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.

- 3) Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 Variant reaction tubes (green foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
- Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional SARS-CoV-2 reaction tubes (1G foil in case of VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
- In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 Variant (if not already created see Section 8.3.1).
- Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).

- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

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

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

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

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

Results should be read and analyzed using the following table:

HV 69/70 deletion target (475/520)	K417N mutation target (530/565)	K417T mutation target (585/630)	Endogenous Internal Control (630/665)	Interpretation
+	-	-	+/- 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).

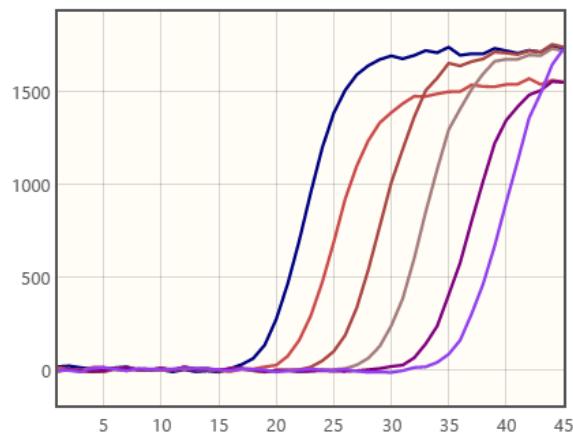


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417N mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).

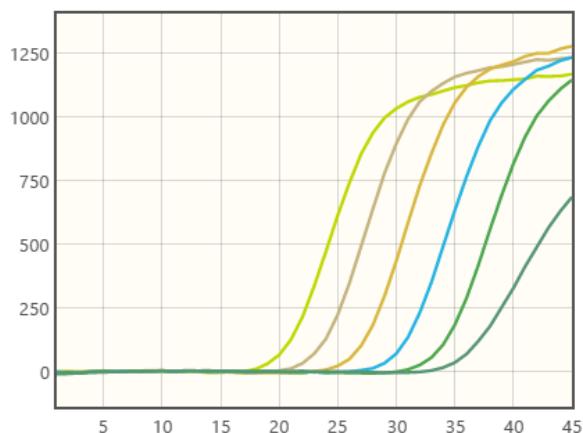
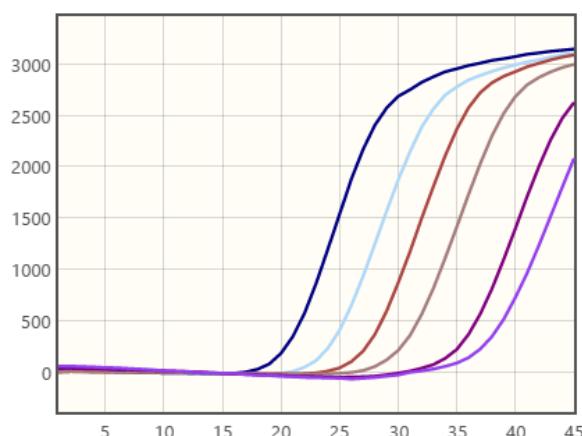


Figure 4. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant (K417T mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^5 - 5.2×10^1 genome copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (585/630 (ROX) channel).



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.

TÜRKÇE

1. Kullanım amacı

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü ve tükürük örneklerinde SARS-CoV-2'nin SARS-CoV-2 Alpha (soy B.1.1.7), Beta (soy B.1.351) ve Gamma (soy P.1) varyantları ile ilişkili S geninde HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonunun kalitatif tespiti için tasarlanmış, otomatik, gerçek zamanlı bir -RT-PCR testidir.

Testin, SARS-CoV-2 pozitif numunelerde veya sağlık uzmanlarının (HCP) Coronavirus hastalığı 2019 (COVID-19) bulunduğuundan şüphelendiği hastalardan alınan örneklerde, VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) ile gerçekleştirildiğinde kullanılması tasarılmıştır.

Bu testin, S geninde HV 69/70 delesyonu, K417N veya K417T mutasyonlarını taşıyan varyantların prevalansını izlemek ve kontrol önlemlerine yardımcı olmak için destek olarak kullanılması amaçlanmıştır. Analiz, BD MAX™ System Sistemini, otomatik olarak RNA'nın ekstraksiyonu için kullanır ve ardından BD MAX™ System için evrensel reaktifler ve atılabılır maddeler ile birlikte sağlanan reaktiflerin kullanıldığı gerçek zamanlı RT-PCR'yi kullanır. RNA solunum numunelerinden ekstrakte edilir ve tamamlayıcı DNA'ya (cDNA); RT-PCR kullanılarak amplifikasyon uygulanır ve HV 69/70 delesyonu, K417N veya K417T mutasyonlarına özel floresan raportör boyalı probalar kullanılarak tespit edilir.

2. Özет ve Açıklama

Koronavirüs, segmentlere ayrılmamış pozitif-duyarlı RNA virüsüdür ve Coronaviridae familyasına aittir [1,2]. İnsan hastalıklarına neden olduğu bilinen altı koronavirüs türü vardır [2]. Dört virus (229E, OC43, NL63 ve HKU1) soğuk algınlığı semptomlarına neden olurken, diğer ikisi (ciddi akut solunum sendromu koronavirüs (SARS-CoV) ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüs (MERS-CoV) zoonotiktir ve daha ciddi komplikasyonlara neden olurlar [2]. SARS-CoV ve MERS-CoV, son yirmi yılda 10.000'den fazla kümülatif vakaya neden olmuştur ve mortalite oranları MERS-CoV için %34 ve SARS-CoV için %10'dur [1,3].

Aralık 2019'da, Çin'in Hubai Eyaleti, Wuhan kentindeki Huanan deniz ürünleri pazarında çalışan veya yakınlarında yaşayan bazı insanlarda, nedeni bilinmeyen pnömoni görüldü [2,4]. Solunum numunelerinin derin sekans analizi, ilk olarak 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV) ve son zamanlarda SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüsü ortaya koydu [5].

SARS-CoV-2'nin semptomların görülmemiği kuluçka döneminde bile insandan insana bulaştığı doğrulanmıştır ve virus, SARS-CoV virusünün yol açıklarına benzer ciddi bir solunum yolu hastalığına neden olmaktadır [1,6,7,8]. Pnömoni virusle bağlantılı başlıca hastalık olmasına rağmen, az sayıda hastada ciddi pnömoni, pulmoner ödem, akut solunum yetersizliği sendromu veya çoklu organ yetmezliği ve ölüm meydana gelmiştir [1,4]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers of Disease Control and Prevention, CDC), SARS-CoV-2 semptomlarının ortaya çıkma süresinin virüse maruz kalındıktan sonra 2 gün kadar kısa veya 14 gün kadar uzun olabileceğine ve en yaygın semptomların ateş veya üşüme, öksürük, yorgunluk, anoreksi kas ağrısı ve nefes darlığı olduğuna inanmaktadır [1,4, 6,9]. Daha az görülen semptomlar boğaz ağrısı, burun tikanması, baş ağrısı, ishal, bulantı ve kusmadır [1,4]. Solunum semptomlarının başlangıcından önce koku kaybı (anosmi) veya tat kaybı (ağzı) da bildirilmiştir [9]. İleri yaşındaki

yetenekler ve kalp veya akciğer hastalığı ya da diyabet gibi altta yatan ciddi tıbbi rahatsızlıklar olan kişiler, COVID-19 hastalığı nedeniyle daha ciddi komplikasyonlar geliştirme açısından daha yüksek risk altındadır [10].

COVID-19 tanısı pnömoninin geleneksel nedenlerini erkenden saptamak için yapılır ve yeni nesil sekanslama veya gerçek zamanlı RT-PCR yöntemleri ile belirlenir [1,11]. Çin CDC (gen hedefleri, ORF1ab ve N), Charité - Almanya (gen hedefleri, RdRP ve E) veya ABD CDC (N geninde iki hedef) gibi SARS-CoV-2'yi saptayan çeşitli deneyler şu anda mevcuttur [12].

CDC, SARS-CoV-2'nin tanımlanması için üst solunum yolu örneklerinin (çoğunlukla bir sağlık profesyoneli tarafından toplanan nazofarengeal (NP) ve orofaringeal (OP) swablar, nazal orta türbinat swab, nazal swab, nazofarengeal yıkama/aspirat veya nazal yıkama/aspirat (NW) ve tükürük örnekleri) ve/veya alt solunum yolu örneklerinin (balgam, endotrakeal aspirat veya daha şiddetli solunum hastalığı olan hastalarda bronkoalveolar lavaj) kullanılmasını önerir [11]. Ayrıca, virüsün varlığını izlemek için kan, idrar ve dışkı gibi diğer klinik numuneler de alınabilir [11,12].

SARS-CoV-2'nin ilk genomik karakterizasyonundan bu yana virüs, farklı genetik gruptara veya kümelere (GH ve GR alt grupları ile S, L, V, G) bölünmüştür. Mutasyonların ortaya çıkması, virüsün evrim sürecinde doğal ve beklenen bir olaydır. Aslında, bazı spesifik mutasyonlar, şu anda küresel olarak dolaşan viral genetik gruptarı tanımlar. Bugüne kadar tanımlanan mutasyonlar, bir koronavirüs için beklenen kalıplar içinde kalır. Genetik grup G'de sınıflandırılan virüsler dünya çapında en sık görülenlerdir. Patojenin dünya çapındaki genetik dizilimi sayesinde, virüsün yayılma ve evrim modellerini oluşturmak mümkün olmuştur.

14 Aralık 2020'de Birleşik Krallık, Ülkesinin bazı bölgelerinde SARS-CoV-2 insidansında, virüsün sözde daha büyük bulaşma kapasitesine sahip yeni bir varyant ile ilişkili bir artışı duyurdu. Alfa varyant (B.1.1.7) olarak adlandırılan bu varyant 23 farklı mutasyon teşkil ediyordu: 13 eş anlamlı olmayan, spayk proteininde (S) bir dizi mutasyon, 4 delesyon ve 6 eş anlamlı. Aralık ayının sonuna kadar, bu varyant, 6 DSÖ bölgesinin 5'inde 31 ülke ve bölgede tespit edildi. Mutasyonlardan biri, spayk proteininde 69-70 pozisyonlarındaki delesyondur. HV 69/70 delesyonunun saptanması, bağılılığı baskınlanmış hastalarda immün szinti ve artmış viral enfektivite ile ilişkili olduğu için büyük önem taşımaktadır. HV 69/70 delesyonu ile ilgili diğer bir endişe nedeni, S genini tespit eden moleküler teknikler (RT-PCR) kullanılarak yapılan virüs tespitinin hassasiyetini etkilemesidir.

HV 69/70 delesyonunun varlığı, Alfa varyantı, soy B.1.1.7 ile ilişkilidir; ancak B.1.1.298 (Danimarka soyu) veya B.1.258 gibi diğer varyantlar da bu delesyona sahiptir.

Beta (B.1.351) varyantı ilk olarak Güney Afrika'daki Nelson Mandela Körfezi'nde Ekim 2020'nin başına kadar uzanan numunelerde tanımlanmıştır. Varyant ayrıca Zambiya'da Aralık 2020'nin sonlarında tanımlandı ve bu sırada ülkedeki baskın varyant olduğu ortaya çıktı. Bu varyant, K417N, E484K, N501Y dahil olmak üzere spayk proteininde çoklu mutasyonlara sahiptir. Bazı EUA monoklonal antikor tedavileri ile, potansiyel nötralizasyon azalması arz eder.

Brezilya'daki SARS-CoV-2 salgınına, Spayk (S) proteininin reseptör bağlama alanında mutasyonları barındıran P.1 ve P.2 olarak adlandırılan iki soy hakimdi. Soy P.1 (Gama olarak anılır), bazı EUA monoklonal antikor tedavileriyle nötralizasyonda potansiyel azalma arz ettiğinden, Endişe Verici bir Varyant (VOC) olarak kabul edilir. Bu Soy, S proteininde (K417T, E484K, N501Y dahil) çoklu mutasyonlar arz eder ve ortaya çıkış Amazonas eyaletinde ikinci bir COVID-19 salgını dalgasıyla ilişkilendirilmiştir. Soy P.2, İzleme Altındaki Varyant (VUM) olarak kabul edilir ve yalnızca E484K mutasyonunu barındırır. P.2 soyu, 2020'nin sonlarında ve 2021'in başlarında ülke genelindeki birçok Amazonas eyaletinde en yaygın varyant olarak tespit edildi.

Virüsün bulaşabilirliğini, virülansını artıran veya doğal enfeksiyon veya aşından sonra üretilen nötralize edici antikorların etkisinden kaçan varyantların ortaya çıkması, pandeminin kontrolü üzerinde önemli bir etkisi olabilecek birinci dereceden bir halk sağlığı sorunu teşkil eder. Bu nedenle, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, Endişe Verici Varyant Alpha, Beta ve Gamma ile ilişkili HV 69/70 delesyonunun, K417N veya K417T mutasyonlarının tespit edilmesini sağlar.

3. Prosedür ilkesi

VIASURE SARS-CoV-2 VariantReal Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, nazofaringeal ve orofaringeal sürüntüler ve tükrük örneklerinde SARS-CoV-2'nin S genindeki HV 69/70 delesyonlu, K417N mutasyonlu ve K417T mutasyonlu RNA'nın kalitatif tespiti için tasarlanmıştır. Tespit, ters transkripsiyonun ve onu izleyen spesifik hedef sekans amplifikasyonunun aynı reaksiyon tüpünde meydana geldiği tek adımlı gerçek zamanlı RT-PCR formatında gerçekleştirilir. İzole edilmiş RNA hedefi, ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA üretecek kopyalanır, bunu spesifik primerler ve floresan etiketli probalar kullanılarak HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonu için SARS-CoV-2 için korunmuş bir S geni bölgesinin amplifikasyonu takip eder.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, DNA polimerazının 5' eksonükleaz aktivitesine dayanır. DNA amplifikasyonu sırasında, bu enzim tamamlayıcı DNA sekansına bağlı probu ayırarak; söndürücü boyanın raportörden ayırt edilmesini sağlar. Bu reaksiyon, hedef şablonun miktarıyla orantılı olan floresan sinyalinde bir artış meydana getirir. Bu floresans BD MAX™ System'de ölçülür.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System her tüpte, stabilize edilmiş bir formatta gerçek zamanlı PCR testi için gerekli tüm bileşenleri (spesifik primer/probler, dNTPS, tampon, polimeraz) ve ayrıca PCR inhibisyonunu izlemek için bir dahili kontrol içerir . Testte, Endojen Dahili Kontrol (IC) olarak bir insan housekeeping geni kullanılır (insan RNase P geni). İnsan housekeeping genleri temel hücre bakımında rol oynar ve bu nedenle tüm çekirdekli insan hücrelerinde bulunması ve nispeten sabit ekspresyon seviyelerini muhafaza etmesi beklenir.

Hedef	Kanal	Gen
HV 69/70 delesyonu	475/520	S geni
K417N mutasyonu	530/565	S geni
K417T mutasyonu	585/630	S geni
Endojen Dahili kontrol (IC)	630/665	insan RNaz P geni

Tablo 1. Hedef, kanal ve genler.

4. Verilen reaktifler

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilen aşağıdaki maddeleri ve reaktifleri içerir:

Reaktif/Materyal	Açıklama	Renk veya Barkod	Miktar
SARS-CoV-2 Variant reaction tube	Enzimler, primer problemleri, tampon, dNTP'ler, stabilizatörler ve stabilize edilmiş formatta endojen dahili kontrol içeren bir karışım	Yeşil folyo	12 şeffaf tüp içeren 2 poşet
Rehydration Buffer tube	Stabilize edilmiş ürünü sulandırmak için solüsyon	11 folyo	24 şeffaf tüp içeren 1 poşet

Tablo 2. VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat içinde sağlanan reaktif ve materyaller. N°. VS-USB124 (444216).

5. Kullanıcı tarafından tedarik edilecek olan reaktifler ve ekipman

Aşağıdaki liste, kullanım için gerekli olan ancak VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System içinde bulunmayan materyalleri ve ekipmanları içerir.

- Gerçek Zamanlı PCR cihazı: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 veya 442828)
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vorteks.
- Mikropipetler (2 ile 1000 µL arasında hatalı).
- Filtre uçları.
- Pudrasız tek kullanımlık eldivenler.
- Opsiyonel: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215)

6. Taşıma ve depolama koşulları

- Kitler, etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar 2-40 °C'de sevk edilip saklanabilir.
- Reaksiyon tüplerini içeren alüminyum poşetler, açıldıktan sonra ürün 28 güne kadar kullanılabilir.

7. Kullanıcılara uyarılar

- Ürün yalnızca moleküler biyolojik teknikler konusunda eğitimli laboratuar veya sağlık uzmanları ve teknisyenler gibi profesyonel kullanıcılar tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.
- *In vitro* tanışal kullanım içindir.
- Son kullanma tarihi geçmiş reaktifleri ve/veya materyalleri kullanmayın.
- Dış kutuyu mühürleyen etiket açılmışsa kiti kullanmayın.
- Koruyucu kutu ulaştığında açılmış veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Koruyucu poşetler ulaştığında açıksa veya kırılmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Reaktif poşetler içinde kurutucu mevcut değilse veya parçalanmışsa reaktifleri kullanmayın.
- Kurutucu maddeyi reaktif poşetlerinden çıkarmayın.
- Her kullanımdan sonra hemen reaktif koruyucu poşetlerin fermuarını kapatın. Kapatmadan önce poşetlerdeki fazla havayı giderin.

- Folyo kırılmış veya hasar görmüşse reaktifleri kullanmayın.
- Farklı poşetlerden ve/veya kitlerden ve/veya partilerden reaktifleri karıştırmayın.
- Reaktifleri nemden koruyun. Neme uzun süre maruz kalmak ürün performansını etkileyebilir.
- Bileşenleri ışktan koruyun.
- Laboratuvarın genel alanında başka PCR testlerinin yapıldığı durumlarda, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 ekstraksiyon kiti, bunun için gerekli herhangi bir reaktif ile Test ve BD MAX™ Sisteminin kontamine olmamasına dikkat edilmelidir. Reaktiflerin mikrobiyal ve ribonükleaz (RNaz)/deoksiribonükleaz (DNaz) kontaminasyonundan daima kaçının. Steril RNaz/DNaz içermeyen, tek kullanımlık, aerosole dirençli veya pozitif deplasmanlı pipet uçlarının kullanılması önerilir. Her numune için yeni uç kullanın. Reaktifler ve kartuşlar (BD MAX™ PCR Cartridge) kullanılmadan önce eldivenler değiştirilmelidir.
- Ortamın amplikonlarla kontaminasyonunu önlemek için, BD MAX™ PCR Cartridge kullandiktan sonra parçalamayın. BD MAX™ PCR Cartridge contaları kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Tek yönlü bir iş akışı tasarlayın. Ekstraksiyon Alanında başlanmalı ve Amplifikasyon ve Tespit Alanında devam edilmelidir. Numuneleri, ekipmanı ve reaktifleri önceki adımın gerçekleştirildiği alana geri götürmeyin.
- İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyun. Koruyucu kıyafet giyin, tek kullanımlık eldivenler, gözlükler ve maske kullanın. Çalışma alanında bir şey yemeyin, içmeyin, sigara kullanmayın veya kozmetik ürünler uygulamayın. Testi bitirdikten sonra ellerinizi yıkayın.
- Numuneler ile numunelere maruz kalan tüm reaktifler ve materyaller potansiyel olarak bulaşıcı ve/veya biyolojik risk taşıyan madde muamelesi görmeli ve ulusal güvenlik düzenlemelerine uygun olarak ele alınmalıdır. Numunelerin toplanması, taşınması, saklanması, kullanımı ve bertarafı sırasında gerekli önlemleri alın.
- Numuneler ve reaktifler biyolojik güvenlik kabininde kullanılmalıdır. Potansiyel olarak bulaşıcı numunelerin işlenmesine yönelik mevcut talimatlara uygun personal protective equipment (PPE) (kişisel koruyucu ekipman) kullanın. Atıkları yerel düzenlemelere ve eyalet düzenlemelerine uygun olarak atın.
- Yaygın olarak kullanılan ekipmanın, özellikle mikropipetler ve çalışma yüzeylerinin düzenli olarak dekontamine edilmesi önerilir.
- "1907/2006 (REACH) sayılı Yönetmelik (AK) uyarınca, "VIASURE Real Time PCR Detection Kits"; Yönetmelik (AK) No 1272/2008'de (CLP) yer alan tehlike sınıfı kriterlerini karşılayan veya söz konusu yönetmelikte beyan için belirlenen değerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunan maddeler ve/veya karışımalar "İçermediklerinden sağlığa ve çevreye zararsız olarak sınıflandırılmaları nedeniyle Malzeme Güvenlik Bilgi Formları (Safety Data Sheets) gerektirmezler.
- Kit, için VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) ile kullanılıyorsa, lütfen ilgili kullanım talimatlarına bakın.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için BD MAX™ System Kullanıcı El Kitabına bakın.

8. Test prosedürü

8.1. Numunelerin toplanması, saklanması ve taşınması

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, her biri viral taşıma ortamında (VTM) toplanan nazofarengeal sürüntüler ve tükürük numuneleri üzerinde test edilmiştir – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD - veya IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) -Guangzhou Enhance

Medical Instruments Co. Ltd ve viral taşıma ortamında (VTM) toplanan orofaringeal swablar - Vircell. Diğer numune türleri kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Toplanan, saklanan ve taşınan numuneler, kullanıcı tarafından doğrulanmış şartlarda muhafaza edilmelidir. Genel olarak, solunum ve tükürük numuneleri taşıma ortamı içeren veya içermeyen (numune türüne göre) temiz kaplarda uygun şekilde toplanmalı ve etiketlenmeli ve testin kalitesini garanti etmek için en kısa sürede işleme konmalıdır. Numuneler patojen materyalin taşınması ile ilgili yerel ve ulusal düzenlemelere uyularak, 72 saatte kadar 2 - 8°C sıcaklıkta taşınmalıdır. Uzun süreli taşımalar için (72 saatten fazla), sevkiyatın °-20°C veya daha düşük sıcaklıkta yapılması önerilir. Test için taze örneklerin kullanılması tavsiye edilir. Örnekler 2 ila 8 °C'de 72 saatte kadar saklanabilir veya -20 °C'de dondurulabilir ya da koruma için ideal olarak -70 °C'de saklanabilir. Numune ve nükleik asitlerin bozulmasını önlemek için tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınılmalıdır.

Nazofaringeal/orofaringeal sürüntü ve saliva numuneleri, uygun laboratuvar talimatlarına uygun şekilde toplanmalı, taşınmalı ve saklanmalıdır. Ayrıntılı bilgi için CED guideline (CDC kılavuzu) belgesine bakın (Specimen collection guidelines (Numune toplama talimatları)). Web sitesi <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> ve Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19 (COVID-19 için Klinik Numunelerin Toplanması, Kullanımı ve Test Edilmesine Yönelik Ara Talimatlar). Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) ve IDSA kılavuzu (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Enfeksiyon hastalıklarının teşhis için mikrobiyoloji laboratuvarını kullanma rehberi: Infectious Diseases Society of America ve American Society for Microbiology (Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği ve Amerikan Mikrobiyoloji Derneği) 2018 güncellemesi. *Clinical Infectious Diseases* (Klinik Bulaşıcı Hastalıklar), 67(6), e1-e94).

8.2. Numunelerin hazırlanması ve RNA ekstraksiyonu

Numune hazırlama işlemini kullanılan ekstraksiyon kiti olan BD MAX™ ExK™ TNA-3'nin kullanım talimatlarındaki önerilere uyarak gerçekleştirin. Bazı numunelerin ön işlem gerektirebileceğini unutmayın. Uygulamaya özel ekstraksiyon hazırlama prosedürleri kullanıcı tarafından geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır.

Nazofaringeal veya orofaringeal örnekler kullanırken:

1. Bir BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube içine viral taşıma ortamında (VTM) veya BD™ Universal Viral Transport (UVT) Sisteminde 400 ve 750 µL nazofaringeal veya orofaringeal sürüntü numunesini pipetleyin ve tüpü bir septum başlığıyla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

Taşıma ortamında toplanan tükürük numunelerinin kullanılması durumunda:

1. Tükürük numuneleri 1:3 oranında (tükürük:ortam) Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) veya IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) içinde toplanabilir. Yüksek hızda 1 dakika vorteksleyin. Ardından, bir BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube içine 750 µL süspansiyon ekleyin ve tüpü septumlu kapakla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

Düzgün tükürük örnekleri kullanılması durumunda:

1. Tükürügü Viral Transport Medium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) veya IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) ile, tükürük ortamının son oranı 1:3 olacak şekilde birleştirin;. Yüksek hızda 1 dakika vorteksleyin. Ardından bir BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube içine 750 µL süspansiyon ekleyin ve tüpü septumlu kapakla kapatın. Numuneyi 1 dakika boyunca yüksek hızda vorteksleyerek tamamen karıştırın. BD MAX™ System Operation'a (Kullanımına) geçin.

8.3. PCR protokolü

Not: Lütfen ayrıntılı talimatlar için BD MAX™ System Kullanıcı El Kitabına bakın.

8.3.1. VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için PCR test programı oluşturma.

Not: VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için testi zaten oluşturduysanız, 8.3.1 adımını atlayabilir ve doğrudan 8.3.2'ye gidebilirsiniz.

- 1) BD MAX™ System'in "Run" (Çalıştır) ekranında, "Test Editor" (Test Düzenleyici) sekmesini seçin.
- 2) "Create" (Oluştur) düğmesine tıklayın.
- 3) "Test Name" (Test Adı) penceresindeki "Basic information" (Temel Bilgi) sekmesinde, testinize bir ad verin: örneğin VIASURE SARS-CoV-2 Variant.
- 4) "Extraction Type" (Ekstraksiyon Tipi) açılır menüsünde, "ExK TNA-3"yi seçin.
- 5) "Master Mix Format" (Master Karışım Formatı) açılır menüsünde, "Type 5'i (Tip 5) seçin.
 - a. Not: Ürün, BD MAX™ System için VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) ile birlikte kullanılabilir, ardından "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışımı Konsantre Liyofilize MM (Tip 5))'i seçin.
- 6) "Sample extraction parameters" (Numune ekstraksiyon parametreleri) içinde "User defined" (Kullanıcı tanımlı) seçeneğini seçin ve numune hacmini 950 µL olarak ayarlayın.
- 7) "Ct Calculation" (Ct Hesaplaması)'nda "Call Ct at Threshold Crossing" (Eşliğin Geçilmesi Halinde Ct'yi Ara)'yı seçin.
- 8) Yazılım sürümü 5.00 veya üzeri ise, "Custom Barcodes" (Özel Barkodlar) kısmında aşağıdaki yapılandırmayı seçin:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Snap-In 2 Barkod): boş bırakın (SARS-CoV-2 Variant reaction tube (reaksiyon tüpü) ile ilgili olarak barkod yapılandırmasına gerek yoktur).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Snap-In 3 Barkodu): 11 (Rehydration Buffer tube için)
 - c. "snap-In 4 Barcode" (Snap-In 4 Barkodu): SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (reaksiyon tüpü) ve "Rehidrasyon Tamponlu (Tip 5) İkili Ana karışım Konsantre Liyofilize MM (Tip 5)" formatı ile birlikte kullanılrsa 1G (Bölüm 8.3.1).
- 9) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri girin: "Channel Settings" (Kanal Ayarları), "Gains" (Kazanımlar) ve "Threshold" (Eşik) (Tablo 3).

- a. Not: Ürün, VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) ile birlikte kullanılabilir; Snap-In 4 (mavi) konumu için "PCR Ayarları" ve "Test Adımları" tamamlanmalıdır (ilgili kullanım talimatlarına bakınız).

Channel (Kanal)	Alias (Takma İsim)	Gain (Kazanım)	Threshold (Eşik)	Ct Min (Ct Asgari)	Ct Max (Ct Azami)
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

Tablo 3. "PCR Settings" (PCR ayarları).

Not: Her kanal için başlangıç noktası olarak yukarıda listelenen minimum eşik değerlerinin ayarlanması önerilir, ancak eşiklerin floresan eğrilerinin üstel fazı dahilinde ancak arka plan sinyallerinin üzerinde kalmasını sağlamak için nihai ayarların sonuç interpolasyonu sırasında son kullanıcı tarafından belirlenmesi gereklidir. Farklı cihazlar için eşik değeri, farklı sinyal yoğunlukları nedeniyle değişebilir.

- 10) "PCR settings" (PCR ayarları) sekmesinde aşağıdaki parametreleri de girin: "Spectral Cross Talk" (Spektral Tartışma) (Tablo 4).

		False Receiving Channel (Yanlış Alıcı Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasyon Kanalı)	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	-	

Tablo 4. "Spectral cross talk" (Spektral tartışma) parametreleri.

- 11) "Test Steps" (Test Adımları) sekmesine PCR protokolünü girin (Tablo 5).

Step Name (Adım İsmi)	Profile Type (Profil Tipi)	Cycles (Döngüler)	Time (s) (Süreler)	Temperature (Sıcaklık)	Detect (Tespit)
Reverse transcription (Revers transkripsiyon)	Tutma	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Başlangıç denatürasyonu)	Tutma	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denatürasyon ve Yeniden Birleştirme/Genişleştirme (Veri toplama))	2- Sıcaklık	45	10	95°C	-
			61,1	63°C	✓

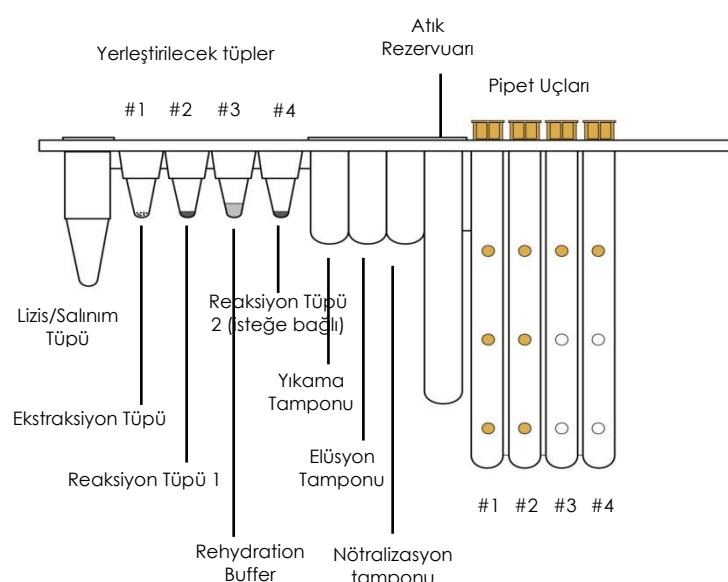
Tablo 5. PCR protokolü.

- 12) "Save Test (Testi Kaydet)" düğmesine tıklayın.

8.3.2. BD MAX™ Raf kurulumu.

- 1) Test edilecek her bir numune için, BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit içinden bir adet Unitized Reagent Strips çıkarın. Tüm sıvıların tüplerin alt kısmında olduğundan ve BD MAX™ System numune raflarına yüklenildiğinden emin olmak için her bir şeridi hafifçe sert bir yüzeye vurun.
- 2) Gerekli sayıda BD MAX™ ExK™ TNA Ekstraksiyon Tüpü'nü (B4) (beyaz folyo) koruyucu poşetlerinden çıkarın. Ekstraksiyon Tüpünü/Tüpelerini (beyaz folyo) TNA şeridindeki ilgili pozisyonlara yerleştirin (1. Yerleştirme pozisyonu, raftaki beyaz renkli kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
- 3) Uygun sayıda SARS-CoV-2 Variant reaction tubes (yeşil folyo) belirleyin ve ayırin ve şeritte karşılık gelen konumlarına yerleştirin (2. Yerleştirme pozisyonu, raftaki yeşil renkli kodlama. Şekil 1'e bakın).
 - a. Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
 - b. Rehidrasyonu doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, lütfen liyofilize ürünün tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
 - i. Not: "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Rehidrasyon Tamponlu Çift Master Karışıklı Konsantre Liyofilize MM (Tip 5))" (Bölüm 8.3.1) biçimini seçerseniz, uygun sayıda ek SARS-CoV-2 reaksiyon tüpünü (VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) testi olması durumunda 1G folyo) belirleyin ve ayırin ve şeritteki karşılık gelen konumlarına oturtun (Snap konumu 4, rafta mavi renk kodlaması. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve alüminyum poşetleri fermuar ile kapatın.
- 4) Gerekli sayıda Rehydration Buffer tubes (11 folyo) çıkarın ve şeritteki konumlarına yerleştirin (3. Yerleştirme pozisyonu, raftaki rensiz kodlama. Şekil 1'e bakın). Fazla havayı çıkartın ve poşeti fermuar ile kapatın.
 - a. Aktarımı doğru şekilde gerçekleştirebilmek için, sıvının tüpün dibinde olduğundan ve tüpün üst kısmına veya folyo kapamasına yapışmadığından emin olun. Tüm tamponun tüpün altında olduğundan emin olmak için her tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.

Şekil 1. BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit içindeki BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA).



8.3.3. BD MAX™ Cihaz kurulumu.

- 1) BD MAX™ System yazılımı v4.50A veya daha üstü sürümünde “Run” (Çalıştır) ekranında “Work List” (İş Listesi) sekmesini seçin.
- 2) “Test” aşağı açılır menüsünde VIASURE SARS-CoV-2 Variant öğesini seçin (daha önce oluşturulmadıysa, Bölüm 8.3.1'e bakın).
- 3) Aşağı açılır menüden uygun kit parti numarasını (kullanılan ekstraksiyon kitinin dış kutusunda bulunur) seçin (isteğe bağlı).
- 4) Barkod tarayıcı ile tarayarak veya elle girerek İş Listesinin (Worklist) “Sample tube” (Numune tüpü) penceresine “Sample Buffer Tube” (Numune Tampon Tüpü) kimlik numarasını girin.
- 5) İş “Worklist” (Listesinin) “Specimen/Patient ID” (Numune/Hasta Kimliği) ve/veya “Accession” (Erişim) penceresini doldurun ve “Save” (Kaydet) düğmesine tıklayın. Tüm Sample Buffer Tube öğeleri (Numune Tampon Tüpleri) girilene kadar devam edin. Numune/hasta kimliğinin ve Sample Buffer Tube öğesinin (Numune Tampon Tüplerinin) doğru şekilde eşleştiğinden emin olun.
- 6) Hazırlanan Sample Buffer Tube öğesini (Numune Tampon Tüpünü) BD MAX™ Racks'a yerleştirin.
- 7) Rafları BD MAX™ System'e yükleyin (A Rafi, BD MAX™ System'in sol tarafında ve B Rafi sağ tarafda yer alır).
- 8) BD MAX™ System'e gerekli sayıda BD MAX™ PCR Cartridges yerleştirin.
- 9) BD MAX™ System'in kapağını kapatın.
- 10) Prosedüre başlamak için “Start Run” (Çalıştırmaya Başla) düğmesine tıklayın.

8.3.4. BD MAX™ raporu

- 1) Ana menüde “Results” (Sonuçlar) düğmesine tıklayın.
- 2) Ya listenizdeki çalıştır tuşuna çift tıklayın ya da “view button”a (görüntüle düğmesi) basın.
- 3) “Print” (Yazdır) öğesine tıklayın ve: “Run Details, Test Details and Plot...” (Çalıştırma Detayları, Test Detayları ve Çizit....) öğesini seçin.
- 4) “Run Reports” (Raporları Çalıştır) ekranında “Print or Export” (Yazdır veya Dışa Aktar) düğmesine tıklayın.

9. Sonuçların yorumlanması

Verilerin nasıl analiz edileceğine dair ayrıntılı açıklama için, BD MAX™ System Kullanım Kılavuzuna bakın.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System analizinin, SARS-CoV-2 RNA için pozitif sonuç veren numuneler üzerinde refleks olarak yapılması amaçlanmıştır. VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ile birlikte SARS-CoV-2 RNA varlığı için durumu bilinmeyen örneklerde kullanılıyorsa, SARS-CoV-2 RNA sonucunun belirlenmesi için sonuçları yorumlama ile ilgili olarak lütfen bu kullanım talimatlarına bakın.

Verilerin analizi, üreticinin talimatlarına göre BD MAX™ yazılımı tarafından yapılır. BD MAX™ yazılımı, aşağıdaki şekilde test edilen her bir numunenin her bir tespit kanalı için Ct değerlerini ve amplifikasyon eğrilerini raporlar:

- 0'ın Ct değeri, belirtilen Eşik değerine sahip yazılım tarafından hesaplanan hiçbir Ct değerinin olmadığını gösterir (bkz. Tablo 3). "0" Ct değeri gösteren numunenin amplifikasyon eğrisi manuel olarak kontrol edilmelidir.

- -1'lik Ct değeri, amplifikasyon işleminin gerçekleşmediğini gösterir.

- Diğer herhangi bir Ct değeri, amplifikasyon eğrisi ile ilintili olarak ve Tablo 6'te verilen numune yorumlama kılavuzlarına göre yorumlanmalıdır.

Amplifikasyon karışımının doğru çalıştığını doğrulamak için Dahili Kontrol sinyalini kontrol edin. Ek olarak, herhangi bir BD MAX™ System hatası raporu olup olmadığını kontrol edin.

Sonuçlar aşağıdaki tabloyu kullanarak okunmalı ve analiz edilmelidir:

HV 69/70 delesyon hedefi (475/520)	K417N mutasyon hedefi (530/565)	K417T mutasyon hedefi (585/630)	Endojen Dahili kontrol (630/665)	Yorumlama
+	-	-	+/- ¹	HV 69/70 delesyonu Tespit edildi¹
-	+	-	+/- ¹	K417N mutasyonu Tespit edildi¹
-	-	+	+/- ¹	K417T mutasyonu Tespit edildi¹
+	+	-	+/- ¹	HV 69/70 delesyonu ve K417N mutasyonu Tespit edildi¹
+	-	+	+/- ¹	HV 69/70 delesyonu ve K417T mutasyonu Tespit edildi¹
-	+	+	+/- ¹	K417N ve K417T mutasyonu Tespit edildi¹
+	+	+	+/- ¹	HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonu Tespit edildi¹
-	-	-	+ ¹	HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonu Tespit edilmedi¹
-	-	-	- ²	PCR reaksiyonunda inhibitörlerin olması ya da numune işleme ve/veya amplifikasyon adımlarında genel bir sorun (hata kodu ile rapor edilmemiş) meydana gelmesi durumunda Çözümlenmemiş (UNR) Sonuç elde edilir. ²
IND	IND	IND	IND	Belirsiz tahlil sonucu (IND). BD MAX™ System arızası nedeniyle. Bir hata koduna bağlı cihaz arızası durumunda gösterilen tahlil sonucu.
INC	INC	INC	INC	Eksik tahlil sonucu (INC). BD MAX™ System arızası nedeniyle. Çalışmanın tamamlanamaması durumunda gösterilen tahlil sonucu.

Tablo 6. Numunelerin yorumlanması.

+: Amplifikasyon meydana geldi.

-: Amplifikasyon meydana gelmedi.

1 Elde edilen Ct değeri 40'tan küçükse, numune pozitif olarak kabul edilir. Endojen Dahili Kontrol (IC) bir amplifikasyon sinyali gösterebilir veya göstermeyebilir. Bazen, hedefin yüksek kopya sayısı, hedefe özel nükleik asitlerin tercihli amplifikasyonuna neden olabileceğinden, IC tespiti gereklidir.

2 HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonu negatif bölgeleri hedeflerse, IC, Ct 35'ten düşük bir amplifikasyon sinyali göstermelidir. Endojen Dahili Kontrol, orijinal numunedeki tüm çekirdekli insan hücrelerinde bulunması gereken bir insan housekeeping geni olduğundan Ct değeri çok değişken olabilir. Endojen Dahili Kontrolde sinyal yokluğu veya ≥ 35 Ct değeri varsa, sonuç 'Çözümlenmemiş' olarak kabul edilir ve yeniden test edilmesi gereklidir.

En çok bilinen Endişe Verici Varyantlarda (VOC) bulunan aşağıdaki soylarla ilişkili mutasyonların özeti:

Soylar	WHO etiketi	S genindeki mutasyonlar ¹		
		HV 69/70 delesyonu	K417N mutasyonu	K417T mutasyonu
B.1.1.7	Alfa	X	-	-
B.1.351	Beta	-	X	-
P.1	Gama	-	-	X

Tablo 7. Bilinen Endişe Verici Varyantlar (VOC) ile ilişkili mutasyonların özeti.

¹<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> (19 Mayıs 2021'e kadar olan veriler).

Diğer varyantlar HV 69/70 delesyonunu ve K417T ve K417N mutasyonlarını arz edebilir; çünkü bunlar bahsedilen varyantlara özgü değildir.

Bir soy için nihai atama, sekans ile yapılmalıdır.

Belirsiz sonucun devam etmesi durumunda, kullanma talimatlarının, kullanıcı tarafından kullanılan ekstraksiyon işleminin gözden geçirilmesi; her bir RT-qPCR adımlının doğru performansının teyidi ve parametrelerin gözden geçirilmesi; ayrıca eğrinin sigmoid şeklinin ve flüoresans yoğunluğunun kontrol edilmesi önerilir.

Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.

10. Testin kısıtlamaları

- Test sonuçları tıbbi geçmiş, klinik semptomlar ve diğer tanı testleri baz alınarak, bir sağlık uzmanı tarafından değerlendirilmelidir.
- Her ne kadar bu analiz diğer numune tipleriyle birlikte kullanılabilse de, Viral Transport Medium (VTM) içinde toplanan nazofaringeal ve/veya orofaringeal swablar ve tükrük örnekleri ile doğrulanmıştır.
- İyi bir test performansı için liyofilize ürün, tüpün altında olmalı ve tüpün üst alanına veya folyo kapamaya yapışmamalıdır. Tüm ürünün tüpün altında olduğundan emin olmak için her bir tüpü sert bir yüzeye hafifçe vurun.
- Reaksiyon karışımının, normalde tüpün altında, normalden farklı (konik şekil olmayan, homojen olmayan, boyut olarak daha küçük/daha büyük ve/veya beyazımsı renkten farklı) stabilize formatta görünümü, testin işlevini değiştirmez.
- Testin kalitesi numunenin kalitesine bağlıdır; solunum numunelerinden uygun şekilde ekstrakte edilmiş nükleik asitlerin varlığı önemlidir.
- Bu test kalitatif bir testtir ve kantitatif değerler sağlamaz veya mevcut organizma sayısını göstermez.
- Bu gibi durumlarda, tespit sınırının altında son derece düşük hedef seviyeleri tespit edilebilir, ancak sonuçlar tekrarlanamayabilir.
- Yüksek konsantrasyonlarda hedef RNA içeren numuneler veya PCR nedeniyle kontaminasyon önceki reaksiyonlardan elde edilen ürünler nedeniyle, HV 69/70 delesyonlu SARS-CoV-2 RNA'nın S genindeki K417N

mutasyonu veya K417T mutasyonu ile çapraz kontaminasyonu nedeniyle yalancı pozitif sonuç olasılığı mevcuttur.

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System içinde kullanılan HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu veya K417T mutasyonunun saptanması için spesifik primer ve prob kombinasyonları; insan genomu, insan mikroflorası veya öngörülebilir yanlış pozitif ile sonuçlanabilecek diğer koronavirüsler ile önemli birleşik homolojiler göstermez.
- Yalancı Negatif sonuçlar, aşağıdakiler dahil çeşitli faktörlerden ve bunların kombinasyonlarından kaynaklanabilir:
 - Uygun olmayan örneklerin toplanması, taşınması, depolanması ve/veya muamele yöntemleri.
 - Uygun olmayan işleme prosedürleri (RNA ekstraksiyonu dahil).
 - Numunelerin taşınması/depolanması ve/veya işlenmesi sırasında viral RNA'nın bozulması.
 - Primer veya prob bağlama bölgelerindeki mutasyonlar veya polimorfizmler, yeni veya bilinmeyen SARS-CoV-2 varyantın tespitini etkileyebilir.
 - Numunedeki test için saptama sınırının altında viral yük.
 - RT-qPCR inhibitörlerinin veya diğer türden müdahale edici maddelerin varlığı. COVID-19'u önlemek için kullanılan veya enfeksiyonun tedavisi sırasında kullanılan ajanların, antiviral terapötik ajanların, antibiyotiklerin, kemoterapötik ajanların veya immünosüpresan ilaçların etkileri değerlendirilmemiştir.
 - Kullanım talimatlarına ve test prosedürüne uyulmaması.
- Orijinal klinik numunedeki düşük insan hücre sayısı nedeniyle bazı numuneler RNase P amplifikasyon eğrilerini gösteremeyebilir. Negatif bir IC sinyali, bir klinik numunedeki HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu veya K417T mutasyonunun varlığını engellemez.
- Pozitif test sonucu, mutlaka canlı virüslerin varlığını göstermez ve bu virüslerin bulaşıcı olduğu veya klinik semptomlara neden olan ajanlar olduğu anlamına gelmez. Ancak pozitif sonuç, hedef viral dizilerin varlığının göstergesidir.
- HV 69/70 delesyonunun varlığı Alfa varyantı (soy B.1.1.7), K417N mutasyonu Beta varyantı (soy B.1.351) ve K417T mutasyonu Gama varyantı (soy P.1) ile ilişkilidir, ancak, bir soy için nihai belirleme sekans yoluyla yapılmalıdır.
- Bu testin pozitif SARS-CoV-2 örnekleriyle kullanılması amaçlandıından, negatif sonuçlar SARS-CoV-2 RNA'sının varlığını engelmez.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kullanılarak Çözümlenmemiş, Belirsiz veya Eksik sonuçların alınması durumunda, yeniden test yapılması gerekecektir. Çözümlenmemiş sonuçlar, numunedeki inhibitörlerin varlığından veya liyofilize edilmiş reaksiyon karışımı tüpünün yanlış rehidrasyonundan kaynaklanabilir. Bir cihaz arızası varsa, Belirsiz veya Eksik sonuçlar elde edilecektir.

11. Kalite kontrol

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, her reaksiyon tüpünde tekniğin doğru biçimde uygulandığını onaylayan Endojen Dahili bir Kontrol (IC) içerir.

12. Performans özelliklerı

12.1. Klinik duyarlılık ve özgüllük

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System 'in klinik performansı, solunum yolu enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan alınan klinik solunum örnekleri (nazofaringeal sürüntüler) kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibiydi:

Saha	Numune türü	İş akışı	Hedef
1	CerTest Biotec SL (Zaragoza, İspanya)	nazofaringeal sürüntü	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System
			HV 69/70 delesyonu
			Mutasyon K417T
			Mutasyon K417N

Tablo 8. Saha, numune türü, iş akışı ve hedef.

BD MAX™ System için VIASURE SARS CoV 2 Variant Real Time PCR Detection Kit için gerçek pozitif ve negatif değerler, yalancı pozitif ve negatif değerler, hassasiyet ve özgüllük, her bir karşılaştırmalı teste göre hesaplanmıştır ve aşağıdaki tablolarda sunulmuştur:

Saha	Karşılaştırma testi	Hedef	TP	TN	FP	FN	Hassasiyet	Özgüllük
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kiti/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit moleküler tahlil + sekanslama	HV 69/70 delesyonu	48	167	0	2	%96 (85 – 99)	%100 (97 – 100)
		Mutasyon K417T	50	167	0	0	%100 (91 – 100)	%100 (97 – 100)
		Mutasyon K417N	7	209	0	1	%88 (46 – 99)	%100 (97 – 100)

Tablo 9. VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için gerçek pozitif (TP) ve negatif (TN) değerler, yalancı pozitif (FP) ve negatif (FN) değerler, hassasiyet ve özgüllük.

Sonuç, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kullanılarak HV 69/70 delesyonu, K417T ve K417N SARS-CoV-2 mutasyonlarını saptama konusunda uyuşma sergiler.

Farklı numune matrislerinin (Vircell, Viral Transport Medium'da (VTM) nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü ve nazofaringeal/orofaringeal sürüntü) uyumluluğunu değerlendirmek için bir uyumluluk çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, üç farklı numune matrisinin VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ile uyumlu olduğunu gösterdi.

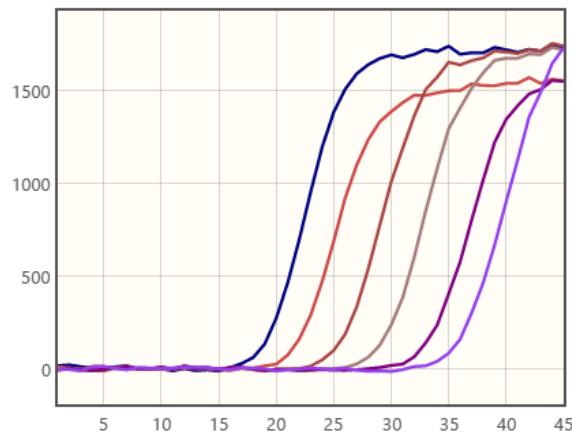
12.2. Analitik hassasiyet

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System için pozitif oranı $\geq 95\%$ olan tespit limiti (LoD) sonuçları aşağıdaki gibidir:

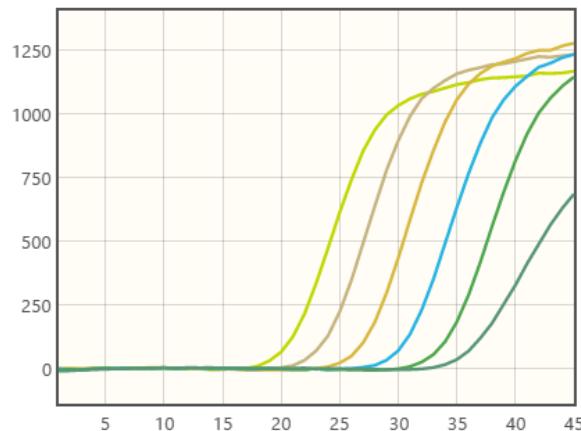
- SARS-CoV-2 B.1.1.7 soyu kullanılarak ölçüldüğünde, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, HV 69/70 delesyonu için nazofaringeal numunelerde ≥ 2 genom kopyası/reaksiyonu ve tükrük numunelerinde ≥ 5 genom kopyası/reaksiyonu tespit limite (LoD) sahiptir.
- SARS-CoV-2 B.1.351 soyu ile ölçüldüğünde, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, nazofaringeal numunelerde ≥ 5 genom kopyası/reaksiyonu ve K417N mutasyonu için tükrük numunelerinde ≥ 5 genom kopyası/reaksiyonu tespit limite (LoD) sahiptir.

- c) SARS-CoV-2 P.1 soyu ile ölçüldüğünde, VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, nazofaringeal numunelerde ≥ 10 genom kopyası/reaksiyonu ve K417T mutasyonu için tükürük numunelerinde ≥ 15 genom kopyası/reaksiyonu tespit limitine (LoD) sahiptir.

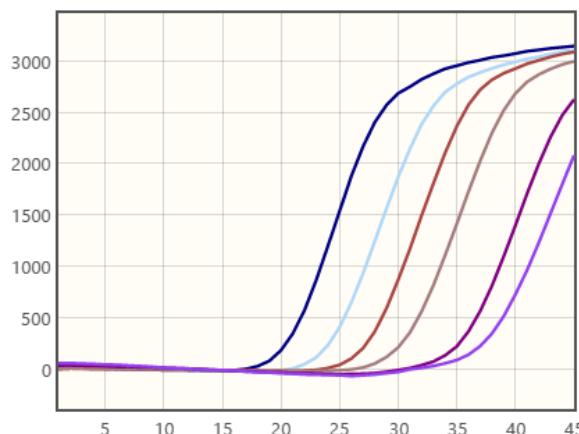
Şekil 2. SARS-CoV-2 Varyanlı (HV 69/70 silme) (sentetik cDNA) (reaksiyon başına $5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ genom kopyası) şablonu dilüsyon serisi BD MAX™ System Sisteminde (475/520 (FAM) kanalında çalışır).



Şekil 3. SARS-CoV-2 Varyanlı (K417N mutasyonu) (sentetik cDNA) (reaksiyon başına $5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ genom kopyası) şablonunun seyreltme serisi BD MAX™ Sisteminde (530/565 (HEX) kanalında çalışır).



Şekil 4. SARS-CoV-2 Varyanlı (K417T mutasyonu) (sentetik cDNA) (reaksiyon başına $5,3 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^1$ genom kopyası) şablonunun seyreltme serisi BD MAX™ Sisteminde (585/630 (ROX) kanalında çalışır).



12.3. Analitik özgüllük

SARS-CoV-2 testinin özgüllüğü, en yaygın solunum patojenlerini temsil eden farklı mikroorganizmalardan oluşan bir panel test edilerek doğrulanmıştır. Test edilen aşağıdaki mikroorganizmaların hiçbirleri arasında çapraz reaktivite tespit edilmemiştir:

Çapraz reaktivite testi				
İnsan Adenovirus tipleri 1-5, 8, 15, 31, 40 ve 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) virüsü	-	İnsan parainfluenza 1, 2, 3 ve 4 virüsleri
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virüsü	-	Pneumocytis jirovecii Tip A1 ve g885652
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virüsü	-	İnsan rino virus
Bordetella pertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virüsü	-	Respiratuvar sinsityal virus (RSV) A/B
Chlamydia caviae	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virüsü	-	SARS Koronavirüs Suş Frankfurt 1
Chlamydia psittaci genotip A ve C	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virüs	-	İnsan 2019-nCoV suşu BetaCoV/Almanya/BavPat1/2020 s.1*
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	İnsan 2019-nCoV suşu 2019-nCoV/İtalya-INMI1*
İnsan koronavirüs 229E, OC43, NL63 ve HKU1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virüs	-	MT007544.1(SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020)*
MERS Koronavirüs	-	Influenza B/Florida/04/06 virüs	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)*
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 ve B3	-	Legionella bozemanii	-	SARS-CoV-2 suşu 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) virüs	-	Legionella pneumophila	-	Staphylococcus aureus
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	İnsan metapnömonivirüs A ve B	-	Streptococcus pneumoniae
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09 virus	-	Moraxella catarrhalis	-	Streptococcus pyogenes

Tablo 10. Bu çalışmada kullanılan referans patojenik mikroorganizmalar.

* Lütfen bu SARS-CoV-2 suşlarının tespitinin bu teste dikkate alınmadığını unutmayın. Bu test, diğerleri arasında, SARS-CoV-2 Alpha, Beta ve Gamma varyantlarında (soylar B.1.1.7, B.1.351 ve P.1) bulunan S genindeki HV 69/70 delesyonu, K417N mutasyonu ve K417T mutasyonunun kalitatif tespiti için tasarlanmıştır.

12.4. Analitik reaktivite

VIASURE SARS-CoV-2 Variant Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System'in reaktivitesi, pozitif sonuçlar gösteren Alpha varyantı (B.1.1.7_710528 UK Variant ve B.1.1.7_601443 UK Varyantı) ile ilişkili iki farklı dizi, Beta Varyantı ile ilişkili bir dizi (Kontrol 16, SARS-CoV-2 soyu B.1.351 Güney Afrika/KRISP-ECK005299/2020) ve Gama varyantıyla ilişkili bir dizi (Kontrol 17, SARS-CoV-2 soyu P.1 Japonya/Brezilya varyantı Japonya/IC-0564/2021) için sentetik RNA kontrollerine karşı değerlendirildi.

Bibliography/ Bibliyografyay

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/ IVD bileşenlerinin ve reaktiflerin sembollerini

IVD	In vitro diagnostic device In vitro tanı cihazı		Keep dry Kuru halde tutun		Use by Son kullanma tarihi		Manufacturer Üretici	LOT	Batch code (Lot) Parti kodu (Lot)
	Consult instructions for use Kullanım talimatlarına bakın		Temperature limitation Sıcaklık sınırlaması		Contains sufficient for <n> test <n> testi için yeterli içerik	DIL	Sample diluent Numune dilüsyonu	REF	Catalognumber Katalog numarası

Trademarks

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

Change Control / Kontrol Değişimi		
Version No. / Versiyon No.	Changes / Değişiklikler	Date / Tarih
00	Original version / Orjinal version.	13/08/2021

Table A 2. Control change table/ Kontrol değişim tablosu.

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