

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



***SARS-CoV-2 Variant II
(P681R+L452R) Real Time PCR
Detection Kit for BD MAX™ System***

CE IVD



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

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENZ
VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System	444218 / VS-VAD124

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

Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation	5
3.	Principle of the procedure	6
4.	Reagents provided	6
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	7
6.	Transport and storage conditions.....	7
7.	Precautions for users	7
8.	Test procedure	8
8.1.	Sample collection, storage and transport.....	8
8.2.	Sample preparation and RNA extraction.....	9
8.3.	PCR protocol	9
9.	Result interpretation	13
10.	Limitations of the test	15
11.	Quality control	16
12.	Performance characteristics.....	16
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	16
12.2.	Analytical sensitivity	18
12.3.	Analytical specificity	18
12.4.	Analytical reactivity	19

Inhalt

1.	Verwendungszweck.....	20
2.	Zusammenfassung und Erläuterung	20
3.	Verfahrensprinzip.....	21
4.	Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	22
5.	Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung	22
6.	Transport- und Lagerbedingungen	22
7.	Sicherheitshinweise für Benutzer	22
8.	Testverfahren	24
8.1.	Probenentnahme, -lagerung und Transport	24
8.2.	Probenvorbereitung und RNA-Extraktion.....	24
8.3.	PCR-Protokoll	25

9.	Ergebnisinterpretation.....	29
10.	Grenzen des Tests.....	31
11.	Qualitätskontrolle	32
12.	Testeigenschaften.....	32
12.1.	Klinische Empfindlichkeit und Spezifität	32
12.2.	Analytische Empfindlichkeit	34
12.3.	Analytische Spezifität	35
12.4.	Analytische Reaktivität	36
	Bibliography/ Literaturverzeichnis.....	37
	Symbols for IVD components and reagents/ Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien	38
	Trademarks.....	38

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is an automated real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of P681R mutation and L452R mutation in the S gene RNA from positive SARS-CoV-2 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 P681R or L452R 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 P681R and L452R mutations.

2. Summary and Explanation

All viruses, including SARS-CoV-2, mutates over time. some changes may affect the virus' properties, such as how easily it spreads, the associated disease severity, or the performance of vaccines, therapeutic medicines, diagnostic tools, or other public health and social measures.

The appearance of genetic mutations is a natural and expected event within the evolution process of a virus. In fact, some specific mutations define the viral genetic groups currently circulating globally. Besides, thanks to the genetic sequencing of the pathogen worldwide, it has been possible to establish patterns of dispersal and evolution of the virus.

At the end of 2020, the appearance of variants with a higher risk for public health prompted the characterization of Variants of Interest (VOI) and Variants of Concern (VOC), in order to facilitate epidemiological control. Some of these SARS-CoV-2 variants are:

Delta (B.1.617.2 lineage) and Kappa (B.1.617.1 lineage) variants were closely associated with a huge COVID-19 increase in India during Spring 2021. Delta variant has multiple mutations in the Spike protein, including P681R and L452R. Kappa variant has also genetic mutations in the Spike protein, including P681R, L452R and E484Q.

All these mutations described above show potential reduction in neutralization by some immunotherapies and reduction of expected effects of vaccines or has been identified to cause community transmission.

That is why, 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 II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been designed to allow the detection of the main mutation associated with the variant under surveillance.

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA with P681R and L452R mutations in the *S* gene of SARS-CoV-2 from positive 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 of SARS-CoV-2 for P681R mutation and L452R mutation using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) 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
P681R mutation	475/520	<i>S</i> gene
L452R mutation	530/565	<i>S</i> gene
Endogenous Internal Control (IC)	585/630	human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Blue 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 II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-VAD124 (444218).

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 II (P681R+L452R) 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 aluminium 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 II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) 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 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 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), BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) 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 II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Note: If you have already created the test for the VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R).
- 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 II (P681R+L452R) 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)	P681R	80	150	0	40
530/565 (HEX)	L452R	80	150	0	40
585/630 (ROX)	IC	80	150	0	35
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

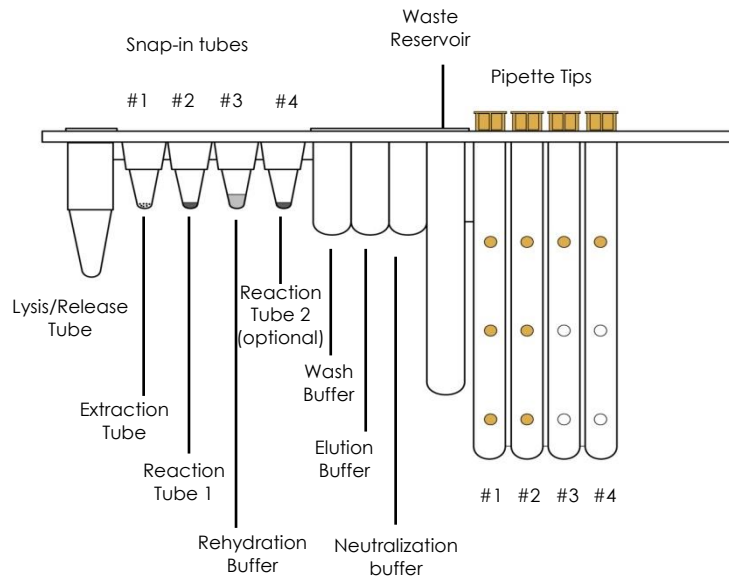
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 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.
- Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tubes (blue 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 aluminium 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 aluminium 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.
 - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select *VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R)* (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull-down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Work List, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Work List and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

Analysis of the VIASURE SARS-CoV-2 *Variant II (P681R+L452R)* 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 analysed using the following table:

P681R mutation target (475/520)	L452R mutation target (530/565)	Endogenous Internal Control (585/630)	Interpretation
+	-	+/- ¹	P681R mutation Detected ¹
-	+	+/- ¹	L452R mutation Detected ¹
+	+	+/- ¹	P681R mutation and L452R mutation Detected ¹
-	-	+ ¹	P681R mutation and L452R mutation Not Detected ¹
-	-	- 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	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

2 In the case of P681R mutation and L452R 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	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

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

¹Tracking SARS-CoV-2 variants: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (data up to 02nd September 2021).

²Overview of Variants/Mutations <https://covariants.org/variants> (data up to 02nd September 2021).

Other variants can present the mutations P681R and L452R 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.
- 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.
- Samples with a Ct value between 35 and 40 might show greater variability in the results obtained.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2 RNA with P681R mutation or L452R 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 P681R mutation or L452R mutation used in VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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 P681R mutation or L452R 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 P681R and L452R mutations is associated with Kappa (lineage B.1.617.1) and Delta (lineage B.1.617.2) variants, 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 II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (nasopharyngeal swabs) already characterized as positive or negative for SARS-CoV-2, from patients. 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	P681R mutation
				L452R mutation

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

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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	P681R mutation	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100% (95 – 100)
		L452R mutation	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

Table 9. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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 II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

The tentative clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with saliva samples was evaluated. Negative saliva single samples spiked with a known concentration of synthetic cDNA fragment for P681R mutation and L452R mutation in the S gene belonging to SARS-CoV-2 were tested. The evaluation was designed to be carried out with 20 positive samples (10 samples 2xLoD and 10 samples 10xLoD) and 10 negative samples. This assay was performed using a 750 µl sample volume of each condition added in the Sample Buffer Tube (SBT) of the TNA-3 Extraction Kit and it was run in full process mode (Automated extraction and PCR amplification) using BD MAX™ ExK™ TNA-3.

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

Saliva sample	Agreement
Positive samples	95%
Negative samples	100%

Table 10. Percentage of agreement of VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with saliva samples.

Besides, a comparative analysis of nasopharyngeal swabs and saliva samples was carried out to evaluate the clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with saliva samples. 7 saliva samples and their corresponding nasopharyngeal sample were analysed and compared observing 100% of concordance. Both mutations (P681R and L452R) were detected in the six saliva samples characterized as Delta variant.

Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
P681R mutation	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*
L452R mutation	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*

Table 11. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* Due to the limited availability of negative samples, the calculation of the clinical specificity of the test could not be performed.

In conclusion, saliva samples were compatible with VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Result show agreement to detect the P681R and L452R mutations using VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System detection limit (LoD) results with a positive rate of $\geq 95\%$ are as follows:

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of ≥ 40 RNA copies/reaction on nasopharyngeal samples and ≥ 250 RNA copies/reaction on saliva samples for P681R mutation.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has a detection limit (LoD) of ≥ 40 RNA copies/reaction on nasopharyngeal samples and ≥ 500 RNA copies/reaction on saliva samples for L452R mutation.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (P681R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).

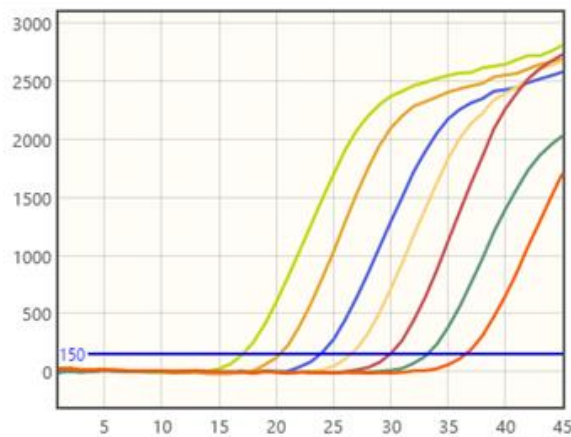
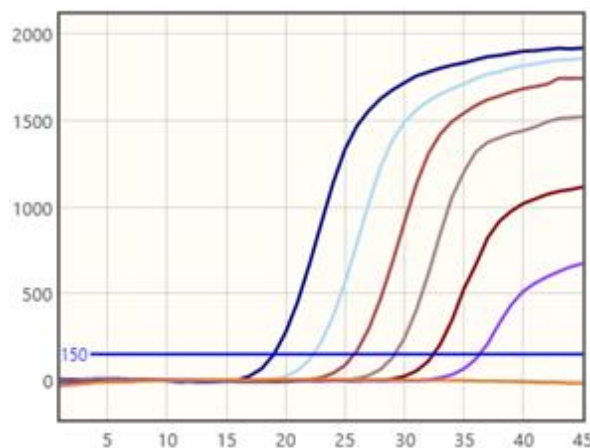


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) 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/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Bocavirus	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Pneumocystis jirovecii Type A1 and g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Human rhinovirus	-
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A/B	-
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Staphylococcus aureus	-
Bordetella pertussis	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Streptococcus pneumoniae	-
Chlamydia caviae	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Streptococcus pyogenes	-
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Gemany/BavPat1/2020 p.1*	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
MERS Coronavirus	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020)*	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020*	-
Enterovirus 68, 71	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*	-
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella pneumophila	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 and SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 lineages (Alpha Variant) *	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09 virus	-	Mycoplasma pneumoniae	-	SARS-CoV-2 B.1.351 lineage (Beta Variant) *	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	Mycobacterium tuberculosis	-	SARS-CoV-2 P.1 lineage (Gamma Variant) *	-

Table 12. 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 P681R mutation and L452R mutation in the S gene present in several SARS-CoV-2 variants.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was evaluated against synthetic RNA controls from Kappa variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021) and clinical samples characterized as Delta variant (B.1.617.2) by sequencing, showing positive results.

DEUTSCH

1. Verwendungszweck

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist ein automatisierter Echtzeit-RT-PCR-Test, der für den qualitativen Nachweis der P681R- und der L452L-Mutation in der S-Gen-RNA in SARS-CoV-2-positiven nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen sowie Speichelproben entwickelt wurde.

Der Assay ist vorgesehen für die Verwendung bei SARS-CoV-2-positiven Proben oder, wenn der Test zusammen mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet wird, bei Proben von Patienten mit Verdacht auf Coronaviruserkrankung-2019 (COVID-19) durch deren Arzt.

Dieser Test ist vorgesehen als Hilfsmittel zur Überwachung der Prävalenz der Mutationen P681R und L452R im S-Gen und zur Unterstützung von Kontrollmaßnahmen. Der Assay nutzt das BD MAX™ System zur automatisierten RNA-Extraktion und anschließenden Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln für das BD MAX™ System. Dazu wird RNA aus Proben extrahiert und komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese wird mittels RT-PCR amplifiziert, um über spezifische Sonden mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff die Mutationen P681R und L452R nachzuweisen.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Alle Viren, darunter SARS-CoV-2, mutieren im Laufe der Zeit. Einige Veränderungen können sich auf die Eigenschaften des Virus auswirken, z. B. darauf, wie leicht es sich ausbreitet, auf den Schweregrad der Erkrankung oder auf die Leistungsfähigkeit von Impfstoffen, therapeutischen Arzneimitteln, Diagnoseinstrumenten oder anderen gesundheitsbezogenen und sozialen Maßnahmen.

Das Auftreten von genetischen Mutationen ist im Zuge der Weiterentwicklung des Virus ein natürliches, zu erwartendes Ereignis. In der Tat definieren einige spezifische Mutationen die derzeit weltweit zirkulierenden viralen Gengruppen. Dank der weltweiten genetischen Sequenzierung des Erregers war es außerdem möglich, Muster für die Verbreitung und Entwicklung des Virus zu erstellen.

Ende 2020 wurden angesichts des Auftretens von Varianten, die ein höheres Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellen, „Variants of Interest“ (VOI) und „Variants of Concern“ (VOC) definiert, um die epidemiologische Kontrolle zu erleichtern. Einige dieser SARS-CoV-2-Varianten sind:

Die Varianten Delta (Linie B.1.617.2) und Kappa (Linie B.1.617.1) wurden im Frühjahr 2021 in Indien eng mit einem enormen COVID-19-Anstieg in Zusammenhang gebracht. Die Delta-Variante enthält mehrere Mutationen im Spike-Protein, darunter P681R und L452R. Die Kappa-Variante weist ebenfalls genetische Mutationen im Spike-Protein auf, darunter P681R, L452R und E484Q.

Alle diese oben beschriebenen Mutationen zeigen eine potenzielle Verringerung der Neutralisierung durch einige Immuntherapien und eine Verringerung der erwarteten Wirkung von Impfstoffen oder wurden als Ursache für eine kommunale Übertragung ermittelt.

Darum stellt das Auftreten von Varianten, die die Übertragbarkeit des Virus beziehungsweise seine Virulenz erhöhen oder gegen die neutralisierende (nach Infektion oder Impfung gebildete) Antikörper unwirksam sind, ein äußerst gravierendes Problem für die öffentliche Gesundheit dar, aus dem sich bedeutende Folgen für die Kontrolle der Pandemie ergeben können.

Aus diesem Grund wurde das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System entwickelt, das den Nachweis der mit der zu überwachenden Variante verbundenen Hauptmutationen ermöglicht.

3. Verfahrensprinzip

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde entwickelt für den qualitativen Nachweis von RNA mit den Mutationen P681R und L452R im S-Gen von SARS-CoV-2 in nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen sowie Speichelproben. Der Nachweis erfolgt per Echtzeit-RT-PCR-Verfahren in einem Schritt. Die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der spezifischen Zielsequenz erfolgen dabei in demselben Reaktionsgefäß. Die isolierte RNA-Zielsequenz wird mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Darauf folgt die Amplifikation einer konservierten Region des S-Gens von SARS-CoV-2 mit den Mutationen P681R und L452R unter Verwendung spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Sonden.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom BD MAX™ System gemessen.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Röhrchen bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTP, Puffer, Polymerase, Reverse Transkriptase) in stabilisierter Form sowie eine endogene interne Kontrolle zur Überwachung des Extraktionsprozesses und/oder einer eventuellen Inhibition der Polymeraseaktivität. Der Assay nutzt ein bei Menschen vorkommendes Housekeeping-Gen – das humane RNase P-Gen – für die endogene interne Kontrolle (IK). Humane Housekeeping-Gene sind an den grundlegenden Zellerhaltungsfunktionen beteiligt. Daher wird davon ausgegangen, dass sie in allen kernhaltigen menschlichen Zellen vorliegen und relativ konstante Expressionsniveaus zeigen.

Zielsequenz	Kanal	Gen
P681R-Mutation	475/520	S-Gen
L452R-Mutation	530/565	S-Gen
Endogene interne Kontrolle	585/630	humanes RNase P-Gen

Tabelle 1. Zielsequenz, Kanal und Gene.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien:

Reagenz/Material	Beschreibung	Farbe oder Strichcode	Menge
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	Mischung aus Enzymen, Primern, Sonden, Puffer, dNTP, Stabilisatoren und einer endogenen internen Kontrolle in stabilisierter Form	Blaue Folie	2 Beutel mit je 12 transparenten Röhrchen
Rehydration Buffer tube	Lösung zur Rekonstitution des stabilisierten Produkts	11-Folie	1 Beutel mit je 24 transparenten Röhrchen

Tabelle 2. Reagenzien und Materialien im VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System mit der Kat.-Nr. VS-VAD124 (444218).

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

In der nachstehenden Liste sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

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

6. Transport- und Lagerbedingungen

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

7. Sicherheitshinweise für Benutzer

- Dieses Produkt ist ausschließlich für den Gebrauch durch professionelle Anwender bestimmt, beispielsweise Labor- oder Gesundheitsfachkräfte und Techniker, die für molekularbiologische Verfahren geschult sind.
- *In-vitro*-Diagnostikum.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.

- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Die Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.
- Die Komponenten vor Licht schützen.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests in demselben allgemeinen Bereich des Labors durchgeführt werden, ist darauf zu achten, dass das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ Ex™ TNA-3 extraction kit, alle für Tests erforderlichen zusätzlichen Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Vermeiden Sie unter allen Umständen die Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) beziehungsweise Desoxyribonuklease (DNase). Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen (BD MAX™ PCR Cartridge) müssen die Handschuhe gewechselt werden.
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung implementieren. Der Arbeitsfluss sollte im Extraktionsbereich beginnen und zum Amplifikations- und Detektionsbereich übergehen. Keine Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien in einen Bereich zurückholen, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.
- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für VIASURE Real Time PCR Detection Kits aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da Stoffe und/oder Gemische, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die

GefahrenEinstufung erfüllen, nicht darin enthalten sind bzw. in Konzentrationen vorliegen, die über dem in der genannten Verordnung festgelegten Wert für ihre Deklaration liegen.

- Wenn das Kit in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet wird, beachten Sie bitte die zugehörige Gebrauchsanleitung.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch zum BD MAX™ System.

8. Testverfahren

8.1. Probenentnahme, -lagerung und Transport

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde getestet an nasopharyngealen Abstrichen und Speichelproben, die beide in Virentransportmedium (VTM) aufbewahrt wurden – Vircell S.L., BD™ Universal Viral Transport (UVT) System, BD oder IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM), Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd – sowie an oropharyngealen Abstrichen, die in Virentransportmedium (VTM) – Vircell – aufbewahrt wurden. Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

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

Die nasopharyngealen/oropharyngealen Abstriche und Speichelproben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien entnommen, transportiert und gelagert werden. Einzelheiten finden sich in den CDC-Leitlinien (Specimen Collection Guidelines). Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> und Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> und IDSA-Leitlinie (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Probenvorbereitung und RNA-Extraktion

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

Bei Verwendung von nasopharyngealen oder oropharyngealen Proben:

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

Bei Verwendung von in Transportmedium aufbewahrten Speichelproben:

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

Bei Verwendung von unvermischten Speichelproben:

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

8.3. PCR-Protokoll

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

8.3.1. Anlegen eines PCR-Test-Programms für das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie bereits den Test für das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System angelegt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt mit Schritt 8.3.2 fortfahren.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).
- 3) Benennen Sie in der Registerkarte mit den grundlegenden Informationen im Fenster „Test Name“ Ihren Test als „VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R)“.
- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.
- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ die Option „Type 5“ (Typ 5).

- a. Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet werden. Wählen Sie in diesem Fall die Option „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master-Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5)).
- 6) Wählen Sie unter „Sample extraction parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User defined“ (Benutzerdefiniert), und stellen Sie das Probenvolumen auf 950 µl ein.
- 7) Wählen Sie unter „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder eine höhere Version verwenden, wählen Sie unter „Custom Barcodes“ (Benutzerdefinierte Strichcodes) die folgende Konfiguration:
- „Snap-In 2 Barcode“ (Barcode für Snap-In 2): leer lassen (bei SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube ist keine Strichcode-Konfiguration erforderlich).
 - „Snap-In 3 Barcode“ (Barcode für Snap-In 3): 11 (für das Rehydration Buffer tube).
 - „Snap-In 4 Barcode“ (Barcode für Snap-In 4): 1G bei Einsatz in Kombination mit SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube und Format „Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5); Abschnitt 8.3.1).
- 9) Geben Sie in der Registerkarte „PCR settings“ (PCR-Einstellungen) folgende Parameter ein: „Channel Settings“ (Kanaleinstellungen), „Gains“ (Verstärkung) und „Threshold“ (Grenzwert) (Tabelle 3).
- Hinweis: Das Produkt kann in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 444215) verwendet werden. Wählen Sie in dem Fall die Option „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) und bei „Test Steps“ (Testschritte) die Einrastposition Snap-In 4 (blau); beachten Sie bitte die zugehörige Gebrauchsanleitung.

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Verstärkung)	Threshold (Schwellenwert)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	P681R	80	150	0	40
530/565 (HEX)	L452R	80	150	0	40
585/630 (ROX)	IK	80	150	0	35
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabelle 3. „PCR settings“ (PCR-Einstellungen).

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

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

		False Receiving Channel (Falsch-empfangender Kanal)				
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-

Tabelle 4. Parameter für „Spectral Cross Talk“ (Spektrale Übersprechung).

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

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

Tabelle 5. PCR-Protokoll.

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

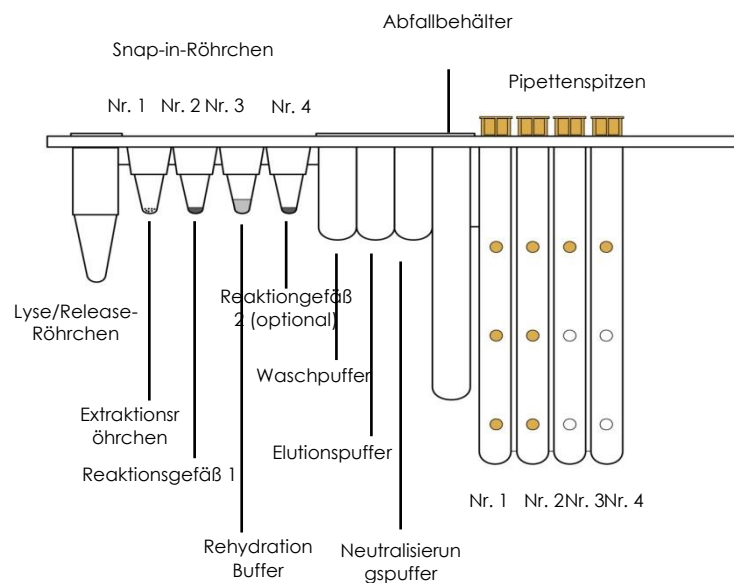
8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Racks

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Einzel-Reagenzstreifen aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhren befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (Extraktionsröhren, B4, weiße Folie) aus den Schutzbeuteln. Lassen Sie das bzw. die Extraction Tube(s) – weiße Folie – in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die geeignete Anzahl an SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tubes (blaue Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydratation bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhren leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrens befindet.
 - i. Hinweis: Wenn Sie das Format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)“ (Dualer Master Mix – konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer (Typ 5); siehe Abschnitt 8.3.1) wählen, bestimmen und separieren Sie

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

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

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



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ Systems (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Work List“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ die Option VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R). (Sofern diese noch nicht angelegt wurde, führen Sie bitte die in Abschnitt 8.3.1 aufgeführten Schritte aus.)
- 3) Wählen Sie (optional) im Auswahlménü die entsprechende Chargennummer des Kits (zu finden an der Außenverpackung des verwendeten Extraktionskits).
- 4) Erfassen Sie die Identifikationsnummer des Probenpufferröhrchens im Probenröhrchen-Fenster der Arbeitsliste durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe.
- 5) Füllen Sie die Felder im Fenster „Specimen“ (Probe)/„Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Eingang) der Arbeitsliste aus, und klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern). Führen Sie diese Schritte für sämtliche Sample Buffer Tubes Probenpufferröhrchen aus. Vergewissern Sie sich, dass die Proben/Patienten-ID und die Probenpufferröhrchen genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Sample Buffer Tube Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™ Rack(s).

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

8.3.4. BD MAX™ Bericht

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

9. Ergebnisinterpretation

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

Die Analyse mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist vorgesehen als Reflex-Test bei Proben mit positivem Ergebnis für SARS-CoV-2-RNA. Bei Einsatz in Kombination mit dem VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for MAX™ System für Proben mit unbekanntem Status hinsichtlich des Vorhandenseins von SARS-CoV-2-RNA beachten Sie bitte diese Gebrauchsanleitung bei der Interpretation der Ergebnisse.

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

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 3). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 gibt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat.
- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 6 auszuwerten.

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

Die Ergebnisse sind anhand folgender Tabelle abzulesen und auszuwerten:

Zielregion P681R-Mutation (475/520)	Zielregion L452R-Mutation (530/565)	Endogene interne Kontrolle (585/630)	Interpretation
+	-	+/- ¹	P681R-Mutation nachgewiesen ¹
-	+	+/- ¹	L452R-Mutation nachgewiesen ¹
+	+	+/- ¹	P681R- und L452R-Mutationen nachgewiesen ¹
-	-	+ ¹	P681R- und L452R-Mutationen nicht nachgewiesen ¹
-	-	- ²	Unresolved (UNR) Unklares Testergebnis aufgrund des Vorliegens von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten.²
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmtes Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeführten Durchlaufs angezeigt.

Tabelle 6. Probenauswertung.

+: Amplifikation erfolgt.

-: Keine Amplifikation erfolgt.

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

² Im Fall eines negativen Ergebnisses bei den Zielregionen P681R-Mutation und L452R-Mutation muss die IK ein Amplifikationssignal mit einem Ct-Wert von weniger als 35 zeigen. Der Ct-Wert kann sehr variabel sein wegen der endogenen internen Kontrolle in Form eines humanen Housekeeping-Gens, das in allen kernhaltigen menschlichen Zellen in der Originalprobe vorliegen sollte. Wenn kein Signal vorhanden ist oder der Ct-Wert der endogenen internen Kontrolle ≥ 35 beträgt, wird das Ergebnis als unklar betrachtet, und der Test muss wiederholt werden.

Zusammenfassung der mit den folgenden Linien assoziierten Mutationen, die in den bekanntesten „Variants of Concern“ (VOC) vorkommen:

Linien	WHO-Kennzeichnung	Mutationen im S-Gen ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

Tabelle 7. Zusammenfassung der Mutationen, die mit bekannten „Variants of Concern“ (VOC) assoziiert sind.

¹Verfolgung von SARS-CoV-2-Varianten: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (Daten bis zum 22. Juni 2021).

²Übersicht über die Varianten/Mutationen <https://covariants.org/variants> (Daten bis zum 22. Juni 2021).

Die Mutationen P681R und L452R können bei anderen Varianten auftreten, da sie nicht spezifisch für die genannten Varianten sind.

Eine endgültige Zuordnung zu einer Linie muss durch Sequenzierung erfolgen.

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

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.
- Dieser Test kann zwar auch mit anderen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für nasopharyngeale/ oropharyngeale Abstriche und Speichelproben validiert.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Farbe als weißlich), hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Die Testqualität hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss ordnungsgemäß aus den Atemwegsproben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Proben mit einem Ct-Wert zwischen 35 und 40 können hinsichtlich der erhaltenen Ergebnisse höhere Schwankungen zeigen.
- Es besteht die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse aufgrund einer Kreuzkontamination durch SARS-CoV-2-RNA mit der P681R- oder L452R-Mutation im S-Gen entweder bei Proben, die hohe Konzentrationen an Ziel-RNA enthalten, oder durch Kontamination mit PCR-Produkten aus früheren Reaktionen.
- Die Kombinationen spezifischer Primer und Sonden zum Nachweis der P681R- und der L452R-Mutation, die im VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System verwendet werden, zeigen keine signifikante kombinierte Homologie mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora oder anderen Coronaviren, die zu vorhersagbaren falsch positiven Ergebnissen führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:

- unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben;
 - unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich RNA-Extraktion);
 - Abbau der viralen RNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben;
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen, die den Nachweis neuer oder unbekannter SARS-CoV-2-Varianten beeinträchtigen können;
 - eine Viruslast in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt;
 - das Vorliegen von RT-qPCR-Inhibitoren oder anderer Arten von Störsubstanzen. Der Einfluss von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, die zur Prävention von COVID-19 oder zur Behandlung der Infektion eingesetzt werden, wurde nicht untersucht;
 - Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Einige Proben ergeben wegen einer zu geringen Zellzahl in der klinischen Originalprobe u. U. keine Amplifikationskurven für *RNase P*. Ein negatives IK-Signal schließt das Vorhandensein der P681R- oder der L452R-Mutation in einer klinischen Probe nicht aus.
 - Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Viren vorliegen oder dass diese Viren infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf die Anwesenheit viraler Zielsequenzen hin.
 - Das Vorhandensein der P681R- und der L452R-Mutation ist mit den Varianten Kappa (Linie B.1.617.1) und Delta (Linie B.1.617.2), assoziiert, die endgültige Zuordnung zu einer Linie muss jedoch durch Sequenzierung erfolgen.
 - Negative Ergebnisse schließen das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA nicht aus, da dieser Assay für die Verwendung mit positiven SARS-CoV-2-Proben vorgesehen ist.
 - Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmaren (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ist eine Testwiederholung erforderlich. Unklare Ergebnisse (UNR) können durch Hemmsubstanzen in der Probe oder eine nicht korrekte Rehydratation des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätestörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System enthält in jedem Reaktionsgefäß eine endogene interne Kontrolle (IK), mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird.

12. Testeigenschaften

12.1. Klinische Empfindlichkeit und Spezifität

Die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde mit klinischen Proben (nasopharyngealen Abstrichen) von Patienten getestet, die bereits als positiv oder negativ für SARS-CoV-2 charakterisiert worden waren. Die Ergebnisse waren wie folgt:

	Untersuchungsstelle	Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	CerTest Biotec S.L (Saragossa, Spanien)	Nasopharyngealabstrich	BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit + BD MAX™ System	P681R-Mutation L452R-Mutation

Tabelle 8. Ort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Wahr positive und wahr negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte sowie Sensitivität und Spezifität beim VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurden in Relation zu verschiedenen Vergleichstests berechnet, wie in der folgenden Tabelle dargestellt ist:

Untersuchungsstelle	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, molekularer Assay und Sequenzierung	P681R-Mutation	99	98	0	1	99% (93–99)	100% (95–100)
		L452R-Mutation	92	98	0	8	92% (84–96)	100% (95–100)

Tabelle 9. Richtig-positive (TP) und negative (TN) Werte, falsch-positive (FP) und negative (FN) Werte, Sensitivität, Spezifität für das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Zur Beurteilung der Kompatibilität verschiedener Probenmatrizen (nasopharyngeale Abstriche, oropharyngeale Abstriche und nasopharyngeale/oropharyngeale Abstriche in Virentransportmedium von Vircell) wurde eine Kompatibilitätsstudie durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die drei verschiedenen Probenmatrizes mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kompatibel sind.

Die voraussichtliche klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System bei Verwendung von Speichelproben wurde beurteilt. Getestet wurden negative Speichelproben, die mit einer bekannten Konzentration eines synthetischen cDNA-Fragments für die P681R- und die L452R-Mutation im S-Gen von SARS-CoV-2 dotiert waren. Das Design der Bewertung sah eine Durchführung mit 20 positiven Proben (10 Proben mit 2xLoD und 10 Proben mit 10xLoD) und 10 negativen Proben vor. Dieser Assay wurde unter allen Bedingungen mit einem Probenvolumen von 750 µl, das in das Sample Buffer Tube (SBT) des TNA-3 Extraction Kits gegeben wurde, und im vollständigen Prozessmodus (automatisierte Extraktion und PCR-Amplifikation) mit BD MAX™ ExK™ TNA-3 durchgeführt.

Die prozentuale Übereinstimmung wurde in Relation zu den erwarteten Ergebnissen für jede einzelne Probe bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Speichelprobe	Übereinstimmung
Positive Proben	95 %
Negative Proben	100%

Tabelle 10. Prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System bei Verwendung von Speichelproben.

Außerdem wurde eine vergleichende Analyse von nasopharyngealen Abstrichen und Speichelproben durchgeführt, um die klinische Leistungsfähigkeit des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System bei Speichelproben zu beurteilen. Es wurden 7 Speichelproben und die dazu korrespondierenden nasopharyngealen Proben untersucht und verglichen, wobei eine Übereinstimmung von 100%

beobachtet wurde. Beide Mutationen (P681R und L452R) wurden in den sechs Speichelproben nachgewiesen, die zuvor als positiv für die Delta-Variante charakterisiert worden waren.

Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität
P681R-Mutation	6	1	0	0	100% (51–100)	k. A.*
L452R-Mutation	6	1	0	0	100% (51–100)	k. A.*

Tabelle 11. Richtig-positive (TP) und negative (TN) Werte, falsch-positive (FP) und negative (FN) Werte, Sensitivität, Spezifität für das VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

* Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von negativen Proben konnte eine Berechnung der klinischen Spezifität des Tests nicht durchgeführt werden.

Daraus folgt, dass Speichelproben mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kompatibel sind.

Die Ergebnisse zeigen beim Nachweis der Mutationen P681R und L452R mit dem VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System Übereinstimmung.

12.2. Analytische Empfindlichkeit

Die Resultate des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System für die Nachweisgrenze für eine Positivrate $\geq 95\%$ lauten wie folgt:

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) für die P681R-Mutation von ≥ 40 RNA-Kopien pro Reaktion bei Verwendung von nasopharyngealen Proben und von ≥ 250 RNA-Kopien pro Reaktion bei Verwendung von Speichelproben.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System hat eine Nachweisgrenze (LoD) für die L452R-Mutation von ≥ 40 RNA-Kopien pro Reaktion bei Verwendung von nasopharyngealen Proben und von ≥ 500 RNA-Kopien pro Reaktion bei Verwendung von Speichelproben.

Abbildung 2. Verdünnungsreihe der Sars-CoV-2-Variante II (P681R-Mutation) (synthetische cDNA) ($5,3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

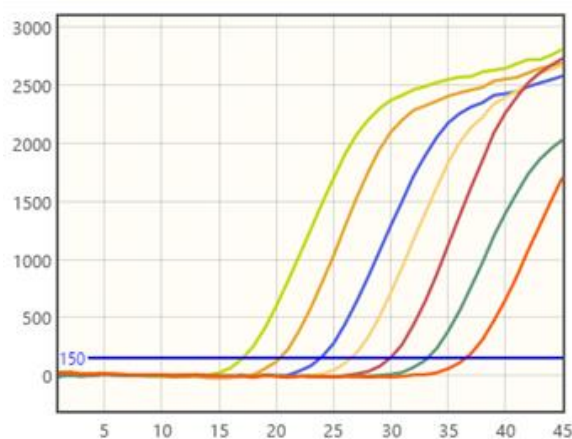
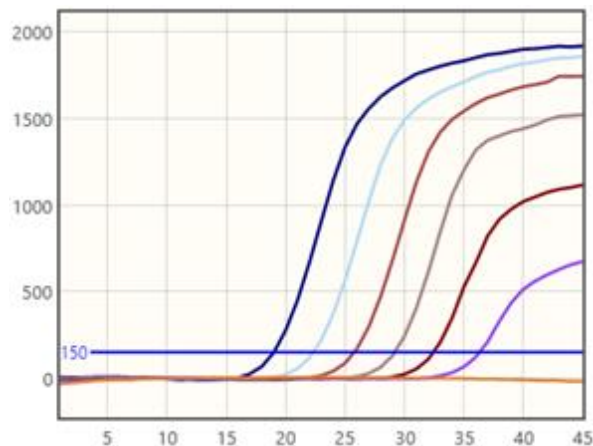


Abbildung 3. Verdünnungsreihe der SARS-CoV-2-Variante II (L452R-Mutation) (synthetische cDNA) ($5,3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ Kopien pro Reaktion), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 530/565 (HEX)).



12.3. Analytische Spezifität

Die Spezifität des SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Assays wurde bestätigt durch Testen eines Panels mit verschiedenen Mikroorganismen, welche die häufigsten Erreger für Atemwegserkrankungen darstellen. Mit keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen konnte eine Kreuzreaktivität festgestellt werden:

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

Test auf Kreuzreaktionen					
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella pneumophila	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)-Virus	-	Humanes Metapneumovirus A und B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 und SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443-Linien (Alpha-Variante) *	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09-Virus	-	Mycoplasma pneumoniae	-	SARS-CoV-2 B.1.351-Linie (Beta-Variante) *	-
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-Virus	-	Mycobacterium tuberculosis	-	SARS-CoV-2 P.1-Linie (Gamma-Variante) *	-

Tabelle 12. Bei dieser Untersuchung verwendete pathogene Referenz-Mikroorganismen.

* Bitte beachten: Der Nachweis dieser SARS-CoV-2-Stämme wird bei diesem Assay nicht berücksichtigt. Dieser Test wurde entwickelt für den qualitativen Nachweis der Mutationen P681R und L452R im S-Gen, die in verschiedenen SARS-CoV-2-Varianten vorliegen.

12.4. Analytische Reaktivität











Die Reaktivität des VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System wurde im Vergleich zu synthetischen RNA-Kontrollen, die von der Kappa-Variante (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021) abgeleitet waren, und zu klinischen Proben, die durch Sequenzierung als positiv für die Delta-Variante (B.1.617.2) charakterisiert worden waren, und positive Resultate ergaben.

Bibliography/ Literaturverzeichnis

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed June 2021.
4. Chen N. *et al.*. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed June 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), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed August 2021.
10. 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 June 2021.
11. 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.
12. 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 June 2021.
13. 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.
14. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
15. 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 June 2021.
16. 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.
17. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
18. 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.

19. World Health Organization. Public health surveillance for COVID-19. 16 December 2020. Available from [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)) Accessed June 2021.
20. Enfermedad por coronavirus, COVID-19, Información Científica-técnica. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, España. 01-2021.
21. 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 June 2021.
22. 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 August 2021.

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

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

Trademarks

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

Change Control / Änderungshistorie		
Version No. / Versionsnr	Changes / Änderungen	Date / Datum
00	Original version / Ursprüngliche Version.	8/10/2021

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

Revision: 8 Oktober 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

