

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 / Ces consignes d'utilisation s'appliquent à la référence suivante :

PRODUCT / PRODUIT	REFERENCE / RÉFÉRENCE
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. / Référence du produit à utiliser avec le BD MAX™ 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

Table des matières

1.	Utilisation prévue	20
2.	Résumé et explication	20
3.	Procédé	21
4.	Réactifs fournis.....	21
5.	Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur.....	22
6.	Conditions de transport et de stockage	22
7.	Précautions pour les utilisateurs	22
8.	Protocole de test.....	24
8.1.	Prélèvement, stockage et transport des échantillons.....	24
8.2.	Préparation de l'échantillon et extraction de l'ARN.....	24
8.3.	Protocole PCR	25

9.	Interprétation des résultats.....	29
10.	Limitations du test.....	31
11.	Contrôle qualité	32
12.	Caractéristiques du test.....	32
12.1.	Sensibilité et spécificité cliniques.....	32
12.2.	Sensibilité analytique	34
12.3.	Spécificité analytique	35
12.4.	Réactivité analytique	36
	Bibliography/ Bibliographie.....	37
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboles pour les composants IVD et réactifs	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.

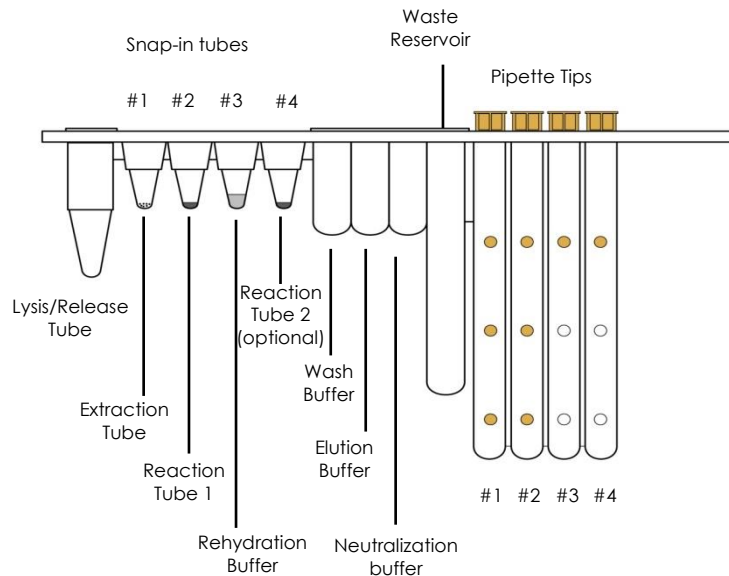
- 12) Click the "Save Test" button.

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).

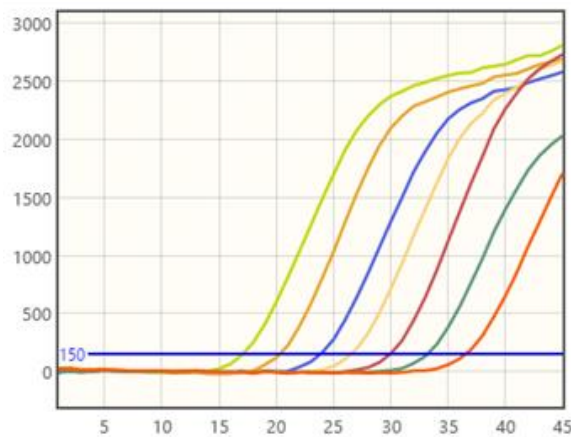
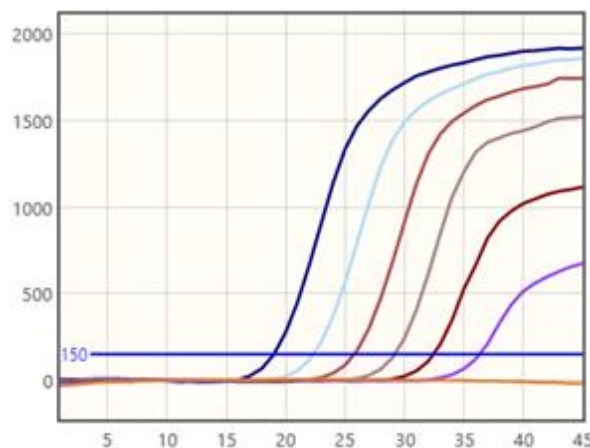


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



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.

FRANÇAIS

1. Utilisation prévue

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est un test RT-PCR en temps réel automatisé conçu pour la détection qualitative de la mutation P681R et de la mutation L452R dans l'ARN du gène S à partir d'écouvillons nasopharyngés et oropharyngés et d'échantillons de salive positifs pour le SARS-CoV-2.

L'utilisation de ce test est indiquée avec des échantillons positifs pour le SARS-CoV-2 ou lorsque le test est réalisé conjointement avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (réf. : 444215) et des échantillons provenant de patients suspectés de Coronavirus 2019 (COVID-19) par leur professionnel de santé.

Ce test est destiné à faciliter à la fois la surveillance de la prévalence des variants porteurs des mutations P681R ou L452R dans le gène S et les mesures de contrôle. Il utilise le BD MAX™ System pour l'extraction automatisée de l'ARN, puis la méthode RT-PCR en temps réel employant les réactifs fournis combinés à des réactifs universels et consommables pour le BD MAX™ System. L'ARN est extrait des échantillons et l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé et amplifié par RT-PCR, puis détecté au moyen de sondes fluorescentes à colorant rapporteur spécifiques pour les mutations P681R et L452R.

2. Résumé et explication

Tous les virus, y compris le SARS-CoV-2, mutent au fil du temps. Certaines modifications peuvent affecter les propriétés du virus, telles que la facilité avec laquelle il se propage, la gravité de la maladie qui lui est associée, ou les performances des vaccins, des médicaments thérapeutiques, des outils de diagnostic ou d'autres mesures sociales et de santé publique.

L'apparition de mutations génétiques est un événement naturel et attendu dans le processus d'évolution d'un virus. En fait, certaines mutations spécifiques définissent les groupes génétiques viraux qui circulent actuellement dans le monde. En outre, le séquençage du génome de l'agent pathogène à travers le monde a permis d'établir des modèles de dispersion et d'évolution du virus.

Fin 2020, l'apparition de variants présentant un risque plus élevé pour la santé publique a conduit à la caractérisation de Variantes d'intérêt (Variants of Interest - VOI) et Variants de préoccupation (Variants of Concern - VOC), afin de faciliter le contrôle épidémiologique. Certains de ces variants du SRAS-CoV-2 sont :

Les variants Delta (lignée B.1.617.2) et Kappa (lignée B.1.617.1) ont été étroitement associés à une augmentation considérable de COVID-19 en Inde au printemps 2021. Le variant Delta comporte de multiples mutations dans la protéine Spike, dont P681R et L452R. Le variant Kappa comporte de multiples mutations dans la protéine Spike, dont P681R, L452R et E484Q.

Toutes ces mutations décrites ci-dessus montrent une réduction potentielle de la neutralisation par certaines immunothérapies et une réduction des effets attendus des vaccins ou ont été identifiées comme étant à l'origine d'une transmission communautaire.

C'est pourquoi l'apparition de variants, qui augmentent la transmissibilité du virus, sa virulence ou qui échappent à l'action des anticorps neutralisants générés à la suite d'une infection naturelle ou du vaccin, constitue un problème de santé publique majeur pouvant avoir un impact considérable sur le contrôle de la pandémie.

Pour cette raison, VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été conçu pour permettre de détecter la principale mutation associée avec le variant sous surveillance.

3. Procédé

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est conçu pour la détection qualitative de l'ARN de la mutation P681R et de la mutation L452R dans le gène S à partir d'écouvillons nasopharyngés et oropharyngés et d'échantillons de salive positifs pour le SARS-CoV-2. La détection se fait en une seule étape par RT-PCR en temps réel au cours de laquelle la transcription inverse et l'amplification ultérieure de la séquence cible spécifique se produisent dans le même tube réactionnel. La cible ARN isolée est transcrite, générant de l'ADN complémentaire par transcriptase inverse qui est suivie par l'amplification d'une zone conservée du gène S pour le SARS-CoV-2 pour les mutations P681R et L452R au moyen d'amorces spécifiques et de sondes marquées d'une molécule fluorescente.

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est basé sur l'activité d'exonucléase de 5' de l'ADN polymérase. Pendant l'amplification de l'ADN, cette enzyme clive la sonde reliée à la séquence de l'ADN complémentaire, séparant le quencher (colorant désactivateur) du rapporteur. Cette réaction entraîne une augmentation du signal de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité de la matrice cible. Cette fluorescence est mesurée sur le BD MAX™ System.

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient dans chaque tube tous les composants nécessaires pour effectuer un test PCR en temps réel (amorces/sondes spécifiques, dNTPS, tampon, polymérase, transcriptase inverse) sous un format stabilisé, ainsi qu'un contrôle interne endogène pour surveiller le processus d'extraction et/ou l'inhibition de l'activité polymérase. Le test utilise un gène domestique humain comme contrôle interne endogène (CI) (gène RNase P humain). Les gènes domestiques humains sont impliqués dans la maintenance des cellules de base et, par conséquent, sont censés être présents dans toutes les cellules humaines nucléées et maintenir des niveaux d'expression relativement constants.

Cible	Canal	Gène
Mutation P681R	475/520	Gène S
Mutation L452R	530/565	Gène S
Contrôle interne endogène (CI)	585/630	Gène RNase P humain

Tableau 1. Cible, canal et gènes.

4. Réactifs fournis

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient les matériaux et réactifs décrits dans le tableau 2 ci-après.

Réactif/matériau	Description	Couleur ou code-barres	Quantité
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	Assortiment comprenant des enzymes, des amorces-sondes, un tampon, des dNTPs, des stabilisateurs et un contrôle interne endogène dans un format stabilisé	Opercule bleue	2 poches de 12 tubes transparents
Rehydration Buffer tube	Solution pour reconstituer le produit stabilisé	Opercule 11	1 poche de 24 tubes transparents

Tableau 2. Réactifs et matériaux fournis dans le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, réf. n° VS-VAD124 (444218).

5. Réactifs et équipement à fournir par l'utilisateur

La liste suivante présente les matériaux et l'équipement indispensables, mais non inclus dans le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Instrument PCR en temps réel : BD MAX™ System (réf. : 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Réf : 442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Réf : 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (exactitude entre 2 et 1000 µl).
- Embouts à filtre.
- Gants jetables sans poudre.
- En option : VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (réf. : 444215)

6. Conditions de transport et de stockage

- Les kits peuvent être expédiés et stockés à une température de 2 à 40 °C jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette.
- La durée d'utilisation du produit est de 28 jours maximum après ouverture des poches en aluminium contenant les tubes réactionnels.

7. Précautions pour les utilisateurs

- L'utilisation de ce produit est strictement réservée aux professionnels, tels que les professionnels et techniciens de laboratoire ou de santé, formés aux techniques de la biologie moléculaire.
- Pour les procédures diagnostiques *in vitro*.
- N'utilisez pas les réactifs et/ou matériaux après la date de péremption.
- N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle la boîte extérieure est déchirée.
- N'utilisez pas les réactifs dont la poche de protection est ouverte ou endommagée à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs dont les poches de protection sont ouvertes ou fissurées à la livraison.
- N'utilisez pas les réactifs sans absorbeur d'humidité ou si celui-ci est cassé à l'intérieur des poches de réactifs.
- Ne retirez pas l'absorbeur d'humidité des poches de réactifs.

- Refermez rapidement les poches de réactifs avec la fermeture à glissière étanche après chaque utilisation. Expulsez tout excès d'air des poches avant de les sceller.
- N'utilisez pas les réactifs dont l'opercule en aluminium est cassé ou endommagé.
- Ne mélangez pas des réactifs provenant de poches, de kits et/ou de lots différents.
- Protégez les réactifs contre l'humidité. Toute exposition prolongée à l'humidité risque d'altérer l'efficacité du produit.
- Conservez les composants à l'abri de la lumière.
- Si d'autres tests PCR sont menés dans la même zone commune du laboratoire, assurez-vous que le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, tout réactif supplémentaire requis pour le test et le BD MAX™ System ne sont pas contaminés. Assurez-vous de toujours éviter tout risque de contamination microbienne et par ribonucléase (RNase)/désoxyribonucléase (DNase) des réactifs. L'utilisation d'embouts de pipette stériles, exempts de RNase/DNase, à usage unique, résistant aux aérosols ou à déplacement positif est fortement recommandée. Utilisez un nouvel embout pour chaque échantillon. Changez de gants avant toute manipulation de réactifs et de cartouches (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Pour éviter toute contamination de l'environnement par des amplicons, abstenez-vous de désassembler la BD MAX™ PCR Cartridge après utilisation. Les joints de la BD MAX™ PCR Cartridge sont conçus pour éviter une contamination.
- Élaborez un flux de travail unidirectionnel. Il doit commencer dans la zone d'extraction, puis se déplacer vers la zone d'amplification et de détection. Ne ramenez pas les échantillons, l'équipement et les réactifs dans la zone où s'est déroulée l'étape précédente.
- Suivez les bonnes pratiques de laboratoire. Portez des vêtements de protection, utilisez des gants, lunettes de protection et masque jetables. Abstenez-vous de manger, de fumer ou d'appliquer des produits cosmétiques dans la zone de travail. Lavez-vous les mains une fois que vous avez terminé le test.
- Traitez les échantillons, ainsi que tout réactif et tout matériau ayant été exposés à ces derniers, comme des agents potentiellement infectieux et/ou présentant un danger biologique, et manipulez-les conformément aux réglementations nationales applicables en matière de sécurité. Prenez les précautions nécessaires pendant la collecte, le transport, le stockage, la manipulation et l'élimination des échantillons.
- Les échantillons et les réactifs doivent être manipulés dans une enceinte de sécurité biologique. Utilisez un équipement de protection individuelle (EPI) conforme aux directives en vigueur pour la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux. Éliminez les déchets conformément aux réglementations locales et nationales.
- Une décontamination régulière de l'équipement fréquemment utilisé est recommandée, en particulier des micropipettes et des surfaces de travail.
- Conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), les VIASURE Real Time PCR Detection Kits ne doivent pas faire l'objet de fiches de données de sécurité (Safety Data Sheets) dans la mesure où ils sont classés comme produits non dangereux pour la santé et l'environnement, dès lors qu'ils ne contiennent aucune substance et/ou composition correspondant aux critères de classification des dangers énoncés dans le règlement (CE) n° 1272/2008 (CLP) ou dont la concentration est supérieure à la valeur établie dans ledit règlement à des fins de déclaration.
- Si le kit est utilisé en association avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (réf. : 444215), veuillez consulter les consignes d'utilisation correspondantes.

- Consultez le mode d'emploi du BD MAX™ System pour en savoir plus sur les avertissements, les précautions et les procédures à respecter.

8. Protocole de test

8.1. Prélèvement, stockage et transport des échantillons

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testé sur des écouvillons nasopharyngés et des échantillons de salive collectés dans un milieu de transport viral (VTM) – Vircell S.L. -, milieu BD™ Universal Viral Transport (UVT) System – BD - ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) - Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, ainsi que sur des écouvillons oropharyngés collectés dans un milieu de transport viral (VTM) - Vircell. Tout autre type d'échantillon doit être validé par l'utilisateur.

La collecte, le stockage et le transport des échantillons doivent être conformes aux conditions validées par l'utilisateur. D'une manière générale, les échantillons respiratoires et de salive doivent être prélevés et étiquetés de manière appropriée dans des conteneurs propres avec ou sans milieu de transport (selon le type d'échantillon) et traités le plus tôt possible afin de garantir la qualité du test. Les échantillons doivent être transportés à une température de 2 à 8 °C jusqu'à 72 heures maximum, conformément aux réglementations locales et nationales relatives au transport de matières porteuses d'agents pathogènes. Pour un transport de longue durée (plus de 72 heures), nous recommandons une expédition à une température ≤ -20 °C. Il est recommandé d'utiliser des spécimens frais pour le test. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'à 72 heures ou congelés à -20 °C ou idéalement à -70 °C pour la conservation. Évitez les cycles de congélation-décongélation répétés afin de ne pas dégrader l'échantillon et les acides nucléiques.

Les échantillons nasopharyngés/oropharyngés et de salive doivent être prélevés, transportés et stockés conformément aux directives spécifiques du laboratoire. Pour en savoir plus, veuillez consulter la directive CDC (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies) (Directives relatives au prélèvement d'échantillons, site web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> et directives provisoires pour le prélèvement, la manipulation et le test d'échantillons cliniques COVID-19. Site web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) et la directive IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). Guide de l'utilisation du laboratoire de microbiologie pour le diagnostic des maladies infectieuses : mise à jour 2018 par la Société américaine des maladies infectieuses et la Société américaine de microbiologie. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Préparation de l'échantillon et extraction de l'ARN

Préparez l'échantillon selon les recommandations figurant dans le mode d'emploi du kit d'extraction utilisé, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Veuillez noter qu'un prétraitement peut s'avérer nécessaire pour certains échantillons. L'utilisateur devra élaborer et valider des procédures de préparation de l'extraction spécifiques à l'application.

Lors de l'utilisation d'échantillons nasopharyngés ou oropharyngés :

1. Pipettez entre 400 et 750 µl de l'écouvillon nasopharyngé ou oropharyngé collecté dans un milieu de transport viral (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) System ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) dans

un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

En cas d'utilisation d'échantillons de salive collectés dans un milieu de transport :

1. Les échantillons de salive peuvent être prélevés dans le milieu de transport viral (VTM), le BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou le IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) à un ratio de 1:3 (salive:milieu). Mélangez l'échantillon au vortex pendant 1 minute. Pipettez 750 µl de l'échantillon dans un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

En cas d'utilisation d'échantillons de salive pure :

1. Combinez la salive avec le milieu de transport viral (VTM), le BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou le IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) afin d'obtenir un ratio final de 1:3 (salive:milieu). Mélangez l'échantillon au vortex pendant 1 minute. Puis, pipettez 750 µl de l'échantillon dans un BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube et fermez le tube avec un bouchon à septum. Mélangez l'échantillon soigneusement avant de l'agiter à haute vitesse au vortex pendant 1 minute. Poursuivez avec le BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocole PCR

Remarque : veuillez consulter le mode d'emploi du BD MAX™ System pour des instructions détaillées.

8.3.1. Création d'un programme de test PCR pour le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Remarque : Si vous avez déjà créé le test pour le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, vous pouvez ignorer l'étape 8.3.1 et passer directement à l'étape 8.3.2.

- 1) Sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System, sélectionnez l'onglet « Test Editor » (Éditeur de test).
- 2) Cliquez sur la touche « Create » (Créer).
- 3) Sous l'onglet « Basic Information » (Informations de base), dans la fenêtre « Test Name » (Nom du test), attribuez un nom à votre test : notamment, VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R).
- 4) Dans le menu déroulant « Extraction Type » (Type d'extraction), sélectionnez « ExK TNA-3 ».
- 5) Dans le menu déroulant « Master Mix Format » (Format Master Mix), sélectionnez « Type 5 ».
 - a. Remarque : L'utilisation de ce produit est possible en association avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Réf. : 444215). Dans ce cas, sélectionnez « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » [Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation (type 5)].
- 6) Dans les « Sample extraction parameters » (Paramètres d'extraction de l'échantillon), sélectionnez « User defined » (Défini par l'utilisateur) et ajustez le volume de l'échantillon à 950 µl.

- 7) Dans le « Ct Calculation » (Calcul Ct), sélectionnez « Call Ct at Threshold Crossing » (Résultats Ct au point d'inflexion).
- 8) Si vous utilisez une version logicielle 5.00 ou supérieure, sélectionnez la configuration suivante sous « Custom Barcodes » (codes-barres personnalisés) :
- « Snap-In 2 Barcode » (Code-barres Snap-In 2) : laisser vide (pas de configuration du code-barres requise pour le tube réactionnel SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube).
 - « Snap-In 3 Barcode » (Code-barres Snap-In 3) : 11 (pour le Rehydration Buffer Tube).
 - « Snap-In 4 Barcode » (Code-barres Snap-In 4) : 1G si utilisé en association avec le tube réactionnel SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube et le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation [type 5])(section 8.3.1).
- 9) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez les paramètres suivants : « Channel Settings » (Réglages des canaux), « Gains » et « Threshold » (Seuil) (tableau 3).
- Remarque : L'utilisation de ce produit est possible en association avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (réf. : 444215). Dans ce cas, les « PCR Settings » (Réglages PCR) et les « Test Steps » (Étapes du test) doivent être effectués pour la position Snap-In 4 (bleu). Veuillez consulter les consignes d'utilisation correspondantes.

Channel (Canal)	Alias (Pseudo)	Gain (Gain)	Threshold (Seuil)	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)	CI	80	150	0	35
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tableau 3. « PCR settings » (Réglages PCR).

Remarque : il est recommandé de définir les valeurs seuils minimales indiquées ci-dessus comme point de départ pour chaque canal, mais les réglages finaux doivent être définis par l'utilisateur final lors de l'interprétation des résultats afin de garantir que les seuils se situent dans la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La valeur seuil peut varier selon les instruments en raison des différentes intensités de signal.

- 10) Sous l'onglet « PCR settings » (Réglages PCR), saisissez également les paramètres crosstalk spectraux « Spectral Cross Talk » (tableau 4) suivants :

		False Receiving Channel (Canal de fausse réception)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal d'excitation)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tableau 4. « Spectral Cross Talk » (Paramètres crosstalk spectraux).

- 11) Sous l'onglet « Test Steps » (Étapes de test), saisir le protocole PCR (tableau 5).

Step Name (Nom de l'étape)	Profile Type (Type de profil)	Cycles (Cycles)	Time (s) (Temps)	Temperature (Température)	Detect (Détection)
Reverse transcription (Transcription inverse)	Maintien	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Dénaturation initiale)	Maintien	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Dénaturation et appariement/extension (collecte de données))	2- température	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tableau 5. Protocole PCR.

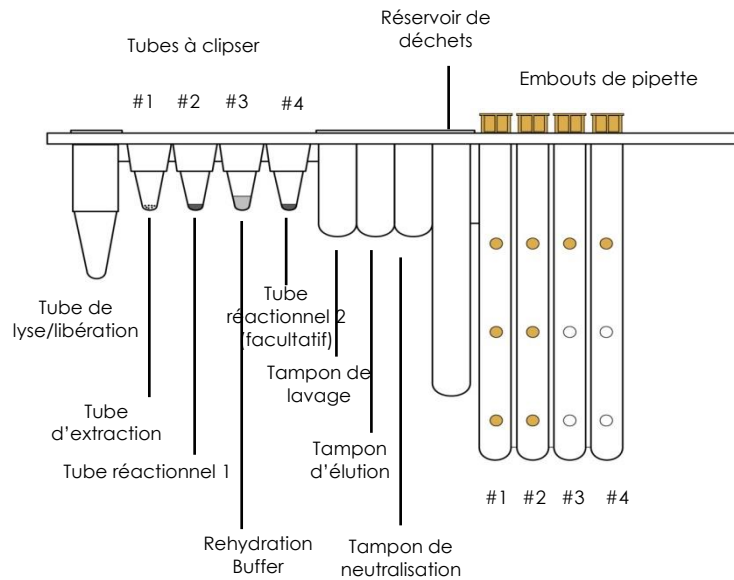
- 12) Cliquez sur la touche « Save Test » (Enregistrer le test).

8.3.2. Préparation du portoir BD MAX™

- 1) Prenez une barrette unitaire de réactifs (Unitized Reagent Strips) du BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit pour chaque échantillon à tester. Tapotez doucement chaque barrette sur une surface dure afin de vous assurer que les liquides se trouvent au fond des tubes et chargez les barrettes sur les portoirs d'échantillons du BD MAX™ System.
- 2) Sortez le nombre nécessaire de tubes d'extraction BD MAX™ ExK™ TNA (B4) (opercule blanc) de leur poche de protection. Clipsez le(s) tube(s) d'extraction (opercule blanc) dans la position correspondante sur la barrette TNA (clip position 1, code couleur blanc sur le portoir - voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.
- 3) Déterminez et séparez le nombre approprié de tubes réactionnels SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube (opercule bleue) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 2, code couleur vert sur le portoir – voir figure 1).
 - a. Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
 - b. Afin d'obtenir une réhydratation optimale, veuillez vous assurer que le produit lyophilisé se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
 - i. Remarque : si vous choisissez le format « Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5) » (Master Mix double, MM lyophilisé concentré avec tampon de réhydratation [type 5])(section 8.3.1), déterminez et séparez le nombre nécessaire de tubes réactionnels SARS-CoV-2 reaction tube supplémentaires [opercule 1G pour le test VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test] et clipsez-les dans les positions correspondantes sur la barrette (clip position 4, code couleur bleu sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez les poches en aluminium avec la fermeture à glissière.
- 4) Sortez le nombre nécessaire de Rehydration Buffer Tubes (opercule 11) et clipsez-les dans leur position sur la barrette (clip position 3, sans code couleur sur le portoir – voir figure 1). Expulsez l'excès d'air et scellez la poche avec la fermeture à glissière.

- a. Afin de réaliser un transfert optimal, veuillez vous assurer que le liquide se trouve au fond du tube et n'adhère pas à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le tampon se trouve entièrement au fond du tube.

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



8.3.3. Préparation de l'instrument BD MAX™

- 1) Sélectionnez l'onglet « Work List » (Liste de travail) sur l'écran « Run » (Exécuter) du BD MAX™ System (logiciel v4.50A ou version supérieure).
- 2) Dans le menu déroulant « Test », sélectionnez VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) (s'il n'est pas créé, voir la section 8.3.1).
- 3) Sélectionnez le numéro de lot correspondant au kit (visible à l'extérieur de la boîte du kit d'extraction utilisé) dans le menu déroulant (facultatif).
- 4) Saisissez le numéro d'identification du Sample Buffer Tube (tube de tampon d'échantillon) dans la fenêtre Sample Tube (tube d'échantillon) de la Work List (Liste de travail), soit en scannant le code-barres, soit par saisie manuelle.
- 5) Renseignez l'identifiant de l'échantillon/du patient et/ou la fenêtre Accession de la Work List (Liste de travail) et cliquez sur la touche « Save » (Enregistrer). Poursuivez ainsi jusqu'à ce que tous les Sample Buffer Tubes soient saisis. Assurez-vous que l'identifiant de l'échantillon/du patient et les Sample Buffer Tubes sont correctement appariés.
- 6) Placez le Sample Buffer Tube préparé dans le(s) portoir(s) du BD MAX™ Rack(s).
- 7) Chargez le(s) portoir(s) dans le BD MAX™ System (le portoir A est positionné du côté gauche de l'instrument et le portoir B du côté droit).
- 8) Chargez le nombre nécessaire de cartouche(s) PCR BD MAX™ Cartridge(s) dans le BD MAX™ System.
- 9) Fermez la porte du BD MAX™ System.
- 10) Cliquez sur « Start Run » (Lancer l'exécution) pour démarrer la procédure.

8.3.4. Rapport BD MAX™

- 1) Dans le menu principal, cliquez sur la touche « Results » (Résultats).
- 2) Faites un double-clic sur votre programme dans la liste ou appuyez sur la touche « View » (Aperçu).
- 3) Cliquez sur « Print » (Imprimer), sélectionnez : « Run Details, Test Details and Plot... » (Détails du programme, détails du test et trame...).
- 4) Cliquez sur la touche « Print or Export » (Imprimer ou Exporter) sur l'écran « Run Reports » (Produire des rapports).

9. Interprétation des résultats

Pour plus de détails sur la manière d'analyser les données, veuillez consulter le mode d'emploi du BD MAX™ System.

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System est conçu pour pratiquer une analyse par réflexe sur des échantillons présentant un résultat positif pour l'ARN du SARS-CoV-2. S'il est utilisé en association avec le VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sur des échantillons dont on ignore s'ils contiennent l'ARN du SARS-CoV-2, veuillez consulter le mode d'emploi pour l'interprétation des résultats afin de déterminer le résultat de l'ARN du SARS-CoV-2.

L'analyse des données est effectuée par le logiciel BD MAX™ selon les instructions du fabricant. Le logiciel BD MAX™ rapporte les valeurs Ct et les courbes d'amplification pour chaque canal détecteur de chaque échantillon testé de la manière suivante :

- Une valeur Ct de « 0 » indique qu'il n'y a pas de valeur Ct calculée par le logiciel avec le seuil spécifié (voir tableau 3). Une courbe d'amplification de l'échantillon affichant une valeur Ct de « 0 » doit faire l'objet d'un examen manuel.
- Une valeur Ct de « -1 » indique qu'aucun processus d'amplification n'a eu lieu.
- Toute autre valeur Ct doit être interprétée en corrélation avec la courbe d'amplification et selon les directives d'interprétation des échantillons énoncées dans le tableau 6.

Vérifiez le signal du contrôle interne pour vous assurer du fonctionnement correct du mélange d'amplification.

Vérifiez en outre qu'il n'y a pas de rapport de défaillance du BD MAX™ System.

Il convient de lire et d'analyser les résultats à l'aide du tableau suivant :

Cible mutation P681R (475/520)	Cible mutation L452R (530/565)	Contrôle interne endogène (585/630)	Interprétation
+	-	+/- ¹	Mutation P681R détectée ¹
-	+	+/- ¹	Mutation L452R détectée ¹
+	+	+/- ¹	Mutation P681R et mutation L452R détectées ¹
-	-	+ ¹	Mutation P681R et mutation L452R non détectées ¹
-	-	- ²	Résultat non résolu (UNR) obtenu en présence d'inhibiteurs de la réaction polymérase ou en cas de problème d'ordre général (non signalé par un code d'erreur) survenu lors du traitement de l'échantillon et/ou des étapes d'amplification. ²
IND	IND	IND	Résultat de test indéterminé (IND, Indeterminate assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché lorsqu'une défaillance de l'instrument est liée à un code d'erreur.
INC	INC	INC	Résultat de test incomplet (INC, Incomplete assay result) En raison d'une défaillance du BD MAX™ System. Résultat du test affiché en cas de défaillance de l'exécution complète.

Tableau 6. Interprétation de l'échantillon.

+ : l'amplification a eu lieu.

- : l'amplification n'a pas eu lieu.

1 Un échantillon est jugé positif si la valeur Ct obtenue est inférieure à 40. Le contrôle interne (CI) endogène peut afficher ou non un signal d'amplification. Parfois, la détection par CI ne s'avère pas nécessaire parce qu'un nombre élevé de copies de la cible peut entraîner une amplification préférentielle des acides nucléiques spécifiques à la cible.

2 Dans le cas de sites cibles négatifs pour la mutation P681R et la mutation L452R, le CI doit afficher un signal d'amplification avec une valeur CT inférieure à 35. La valeur CT peut s'avérer très variable dès lors que le contrôle interne endogène est un gène domestique humain qui devrait être présent dans toutes les cellules nucléées humaines de l'échantillon d'origine. En l'absence de signal ou en cas de valeur Ct ≥ 35 du contrôle interne endogène, le résultat est jugé « non résolu » et un nouveau test est exigé.

Récapitulatif des mutations associées aux lignées suivantes présentes dans les variants préoccupants (VOC, Variants of Concern) les plus connus :

Lignées	Label de l'OMS	Mutations dans le gène ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

Tableau 13. Récapitulatif des mutations associées aux variants préoccupants (VOC, Variants of Concern) connus.

¹Tracking SARS-CoV-2 variants : <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (données jusqu'au 02 septembre 2021).

²Overview of Variants/Mutations <https://covariants.org/variants> (données jusqu'au 02 septembre 2021).

D'autres variants peuvent contenir les mutations P681R et L452R étant donné qu'elles ne sont pas spécifiques aux variants cités.

L'attribution définitive à une lignée doit être effectuée par séquençage.

Si le résultat reste ambigu, il est recommandé de revoir le mode d'emploi, le processus d'extraction mis en œuvre par l'utilisateur, de vérifier la bonne exécution de chaque étape du RT-qPCR et de revoir les paramètres, et enfin, de vérifier la forme sigmoïde de la courbe et l'intensité de la fluorescence.

Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.

10. Limitations du test

- Les résultats du test doivent être évalués par un professionnel de la santé en tenant compte des antécédents médicaux, des symptômes cliniques et d'autres tests diagnostiques.
- Bien que ce test soit compatible avec d'autres types d'échantillons, il a été validé avec des écouvillons nasopharyngés/oropharyngés prélevés dans un échantillon de salive.
- Pour une bonne exécution du test, le produit lyophilisé doit se trouver au fond du tube et ne pas adhérer à la partie supérieure du tube ou à l'opercule de scellage. Tapotez doucement chaque tube sur une surface dure afin de vous assurer que le produit se trouve entièrement au fond du tube.
- Une apparence du mélange réactionnel au format stabilisé, se trouvant normalement au fond du tube, différente de celle habituelle (sans forme conique, inhomogène, de taille plus petite/plus grande et/ou de couleur autre que blanchâtre) n'altère pas la fonctionnalité du test.
- La qualité du test dépend de la qualité des échantillons ; l'acide nucléique doit être extrait de manière correcte des échantillons respiratoires.
- Ce test est un test qualitatif. En tant que tel, il ne fournit pas de valeurs quantitatives ni n'indique le nombre d'organismes présents.
- Il est possible que soient détectés des niveaux très faibles de cibles, inférieurs à la limite de détection, mais que les résultats ne soient pas reproductibles.
- Les échantillons dont la valeur Ct est comprise entre 35 et 40 peuvent présenter une plus grande variabilité dans les résultats obtenus.
- Il existe une possibilité de faux positifs dus à une contamination croisée par l'ARN du SARS-CoV-2 avec une mutation P681R ou une mutation L452R dans le gène S, soit par des échantillons contenant de fortes concentrations de l'ARN cible, soit à cause d'une contamination par transmission à partir de produits PCR de réactions antérieures.
- La combinaison spécifique d'amorce et de sonde pour la détection d'une mutation P681R ou L452R utilisée dans le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ne présente pas d'homologies combinées significatives avec le génome humain, la microflore humaine ou d'autres coronavirus, susceptibles d'entraîner un résultat faux positif prévisible.
- Les résultats faux négatifs peuvent être le fait de plusieurs facteurs et de leurs combinaisons, notamment :
 - Des méthodes de prélèvement, de transport, de stockage et/ou de manipulation des échantillons inappropriées.
 - Des procédures de traitement inappropriées (y compris l'extraction d'ARN).

- La dégradation de l'ARN viral durant l'expédition, le stockage et/ou le traitement de l'échantillon.
 - Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection d'un variant nouveau ou inconnu du SARS-CoV-2.
 - Une charge virale dans l'échantillon inférieure à la limite de détection pour le test.
 - La présence d'inhibiteurs de RT-qPCR ou d'autres types de substances interférentes. L'impact des vaccins, des thérapies antivirales, des antibiotiques, des chimiothérapies ou des médicaments immunosuppresseurs utilisés pour prévenir la COVID-19 ou utilisés pendant le traitement de l'infection n'a pas été évalué.
 - Le non-respect des consignes d'utilisation et de la procédure de test.
- Il est possible que certains échantillons ne présentent pas de courbes d'amplification du *RNase P* en raison du faible nombre de cellules humaines dans l'échantillon clinique d'origine. Un signal CI négatif n'exclut pas la présence de la mutation P681R ou la mutation L452R dans un échantillon clinique.
 - Un résultat de test positif ne traduit pas nécessairement la présence de virus viables et n'implique pas que ceux-ci soient infectieux ou soient les agents responsables des symptômes cliniques. Toutefois, un résultat positif indique la présence de séquences virales cibles.
 - La présence des mutations P681R et L452R est associée au variant Kappa (lignée B.1.617.1) et Delta (lignée B.1.617.2). Cependant, l'attribution définitive à une lignée doit être effectuée par séquençage.
 - Des résultats négatifs n'excluent pas la présence de l'ARN du SARS-CoV-2 dès lors que ce test est conçu pour une utilisation avec des échantillons positifs pour le SARS-CoV-2.
 - En cas de résultats non résolus, indéterminés ou incomplets avec le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, l'exécution d'un nouveau test est exigée. Les résultats non résolus peuvent découler de la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ou d'une réhydratation incorrecte du tube de mélange réactionnel lyophilisé. En cas de défaillance de l'instrument, les résultats obtenus seront indéterminés ou incomplets.

11. Contrôle qualité

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contient, dans chaque tube réactionnel, un contrôle interne endogène (CI) qui confirme la bonne performance de la technique.

12. Caractéristiques du test

12.1. Sensibilité et spécificité cliniques

La performance clinique du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été testée avec des échantillons cliniques (écouvillons nasopharyngés) déjà caractérisés comme étant positifs ou négatifs pour SARS-CoV-2 chez des patients. Les résultats étaient les suivants :

	Site	Type d'échantillon	Flux de travail	Cible
1	CerTest Biotec S.L (Saragosse, Espagne)	écouvillon nasopharyngé	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Mutation P681R
				Mutation L452R

Tableau 7. Site, type d'échantillon, flux de travail et cible.

Les valeurs positives et négatives vraies, les valeurs positives et négatives fausses, la sensibilité et la spécificité pour VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ont été calculées par rapport à chaque test comparateur, comme indiqué dans le tableau suivant :

Site	Test comparateur	Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit test moléculaire + séquençage	Mutation P681R	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100 % (95-100)
		Mutation L452R	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

Tableau 8. Valeurs positives (TP) et négatives vraies (TN), valeurs positives (FP) et négatives fausses (FN), sensibilité, spécificité pour VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Une étude a été réalisée afin d'évaluer la compatibilité de différentes matrices d'échantillons (écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé et écouvillon nasopharyngé/oropharyngé dans le milieu de transport Viral Transport Medium [VTM] de Vircell). Les résultats obtenus ont montré que les trois matrices d'échantillons différentes étaient compatibles avec le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

La performance clinique théorique du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit pour BD MAX™ System sur des échantillons de salive a également été évaluée. Des échantillons uniques de salive négatifs enrichis avec une concentration connue de fragment d'ADNc synthétique pour la mutation P681R ou la mutation L452R dans le gène S de SARS-CoV-2 ont été testés. L'évaluation a été conçue pour être réalisée avec 20 échantillons positifs (10 échantillons 2 fois LoD (2xLoD) et 10 échantillons 10 fois LoD (10xLoD)) et 10 échantillons négatifs. Ce test a été réalisé avec un volume d'échantillon de 750 µl de chacune des conditions ajouté au Sample Buffer Tube (SBT) du TNA-3 Extraction Kit et il a été mené en mode de processus complet (extraction et amplification PCR automatisées) à l'aide du BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Le pourcentage de concordance a été calculé par rapport au résultat anticipé pour chaque échantillon particulier et les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Échantillon de salive	Concordance
Échantillons positifs	95 %
Échantillons négatifs	100%

Tableau 9. Pourcentage de concordance du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System avec des échantillons de salive.

En outre, une analyse comparative des échantillons d'écouvillons nasopharyngés et de salive a été réalisée en vue d'évaluer la performance clinique théorique du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit pour BD MAX™ System sur des échantillons de salive. 7 échantillons de salive et leur échantillon nasopharyngé correspondant ont été analysés et comparés en observant une concordance de 100%. Les deux mutations (P681R et L452R) ont été détectées dans les six échantillons de salive caractérisés comme variant Delta.

Cible	TP	TN	FP	FN	Sensibilité	Spécificité
Mutation P681R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*
Mutation L452R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*

Tableau 10. Valeurs positives (TP) et négatives vraies (TN), valeurs positives (FP) et négatives fausses (FN), sensibilité, spécificité pour VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*En raison de leur manque de disponibilité, les échantillons négatifs n'ayant pas été analysés, le calcul de la spécificité du test n'a pu être effectué.

En conclusion, les échantillons de salive étaient compatibles avec le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Les résultats montrent une concordance pour la détection des mutations P681R et L452R du SARS-CoV-2 avec le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilité analytique

Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System livre des résultats à la limite de détection (LoD, Limit of Detection) avec un taux de positivité $\geq 95\%$ comme suit :

- Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) ≥ 40 copies génomiques par réaction sur des échantillons nasopharyngés et ≥ 250 copies génomiques par réaction sur des échantillons de salive avec la mutation P681R.
- Le VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a une limite de détection (LoD) ≥ 40 copies génomiques par réaction sur des échantillons nasopharyngés et ≥ 500 copies génomiques par réaction sur des échantillons de salive avec la mutation L452R.

Figure 2. Dilution en série du variant de SARS-CoV-2 Variant II (mutation P681R) (ADNc synthétique) ($5.3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 475/520 [FAM]).

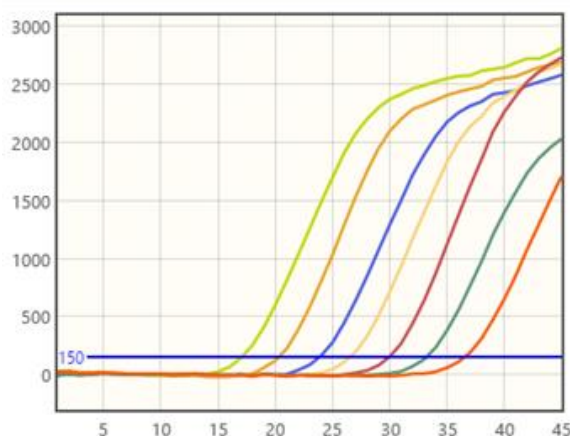
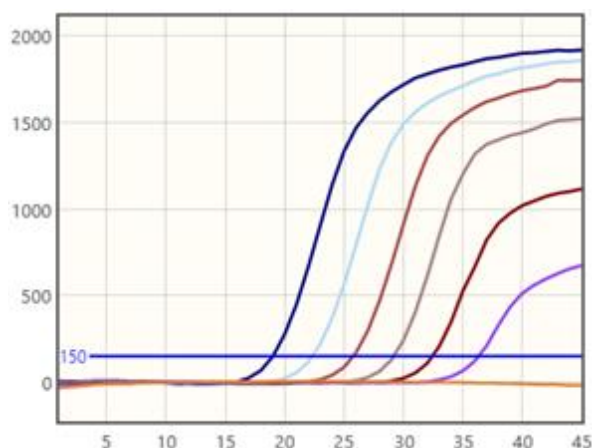


Figure 3. Dilution en série du variant de SARS-CoV-2 Variant II (mutation L452R) (ADNc synthétique) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies génomiques par réaction), modèle réalisé sur le BD MAX™ System (canal 530/565 [HEX]).



12.3. Spécificité analytique

La spécificité du test ciblant la présence du SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) été confirmée par l'analyse d'un panel composé de différents microorganismes représentant les agents pathogènes des voies respiratoires les plus courants. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les microorganismes testés suivants :

Test de réactivité croisée					
Adénovirus humains types 1-5, 8, 15, 31, 40 et 41	-	Virus influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09	-	Virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4	-
Bocavirus	-	Virus influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii type A1 et g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Rhinovirus humain	-
Bordetella holmesii	-	Virus influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virus respiratoire syncytial (RSV) A/B	-
Bordetella parapertussis	-	Virus influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Staphylococcus aureus	-
Bordetella pertussis	-	Virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Streptococcus pneumoniae	-
Chlamydia caviae	-	Virus influenza B/Brisbane/60/2008	-	Streptococcus pyogenes	-
Génotype Chlamydia psittaci A et C	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Souche coronavirus SARS Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Virus influenza B/Phuket/3073/2013	-	Souche 2019-nCoV humaine BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Coronavirus humain 229E, OC43, NL63 et HKU1	-	Virus influenza B/Florida/04/06	-	Souche 2019-nCoV humaine 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
Coronavirus MERS	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020)*	-
Entérovirus coxsackievirus A24, A9 et B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	Souche SARS-CoV-2 2019nCoV/USAWA1/2020*	-
Enterovirus 68, 71	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*	-

Test de réactivité croisée					
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella pneumophila	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*	-
Virus influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Métapneumovirus humain A et B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	Lignées SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 et SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 (Variant Alpha) *	-
Virus influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09	-	Mycoplasma pneumoniae	-	Lignée SARS-CoV-2 B.1.351 (Variant Bêta) *	-
Virus influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-	Lignée SARS-CoV-2 P.1 (Variant Gamma) *	-

Tableau 11. Microorganismes pathogènes de référence utilisés dans cette étude.

* Veuillez noter que la détection de ces souches de SARS-CoV-2 n'est pas prévue dans ce test. Ce test est conçu pour la détection qualitative de la mutation P681R et de la mutation L452R dans le gène S présentes dans les variants du SARS-CoV-2.

12.4. Réactivité analytique











La réactivité du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System a été évaluée par rapport à des contrôles par ARN synthétique du variant Kappa (B.1.617.1 Indie/CT-ILSGS00361/2021) et des échantillons cliniques caractérisés en tant que variant Delta (B.1.617.2) par séquençage, montrant des résultats positifs.

Bibliography/ Bibliographie

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoA2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed 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/ Symboles pour les composants IVD et réactifs

 IVD <i>In vitro</i> diagnostic device Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>	 Keep dry Conserver dans un endroit sec	 Use by Utiliser avant	 Manufacturer Fabricant	 LOT Batch code (Lot) Numéro de lot
 Consult instructions for use Consulter les consignes d'utilisation	 Temperature limitation Limitation de température	 Contains sufficient for <n> test Contenance suffisante pour <n> test(s)	 Sample diluent Diluant d'échantillon	 REF Catalog number Numéro de catalogue

Trademarks

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

Change Control / Contrôle des modifications		
Version No. / Version n°	Changes / Modifications	Date / Date
00	Original version / Version originale.	26/10/2021

Table A 2. Control change table/ Tableau de contrôle des modifications.

Revision: 26 Octobre 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

