

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 / Queste istruzioni per l'uso si applicano al seguente codice:

PRODUCT / PRODOTTO	REFERENCE / CODICE
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. / Codice del prodotto da usare con il 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

Sommario

1.	Usò previsto	20
2.	Introduzione e spiegazione	20
3.	Principi del procedimento.....	21
4.	Reagenti forniti	21
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	22
6.	Condizioni di trasporto e conservazione	22
7.	Precauzioni per gli utenti	22
8.	Procedura del test.....	24
8.1.	Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni.....	24
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione dell'RNA.....	24
8.3.	Protocollo PCR.....	25

9.	Interpretazione dei risultati	29
10.	Limiti del test	30
11.	Controllo di qualità	32
12.	Caratteristiche del test	32
12.1.	Sensibilità e specificità clinica	32
12.2.	Sensibilità analitica.....	33
12.3.	Specificità analitica	34
12.4.	Reattività analitica	35
	Bibliography/Bibliografia	36
	Symbols for IVD components and reagents/Simboli per reagenti e componenti IVD	37
	Trademarks.....	37

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.

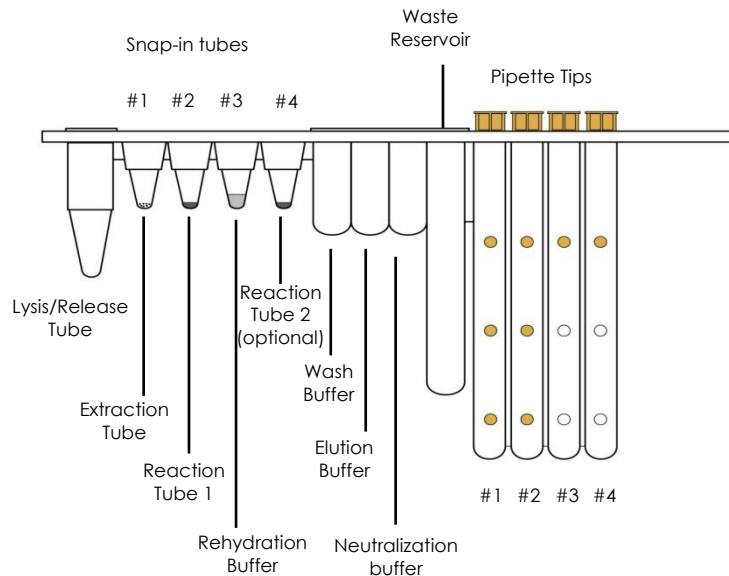
- 12) Click the "Save Test" button.

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).

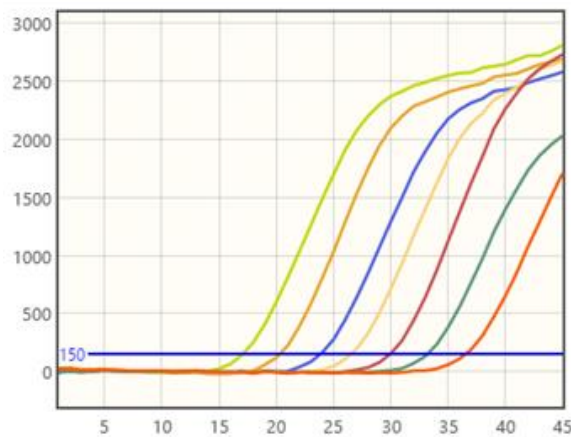
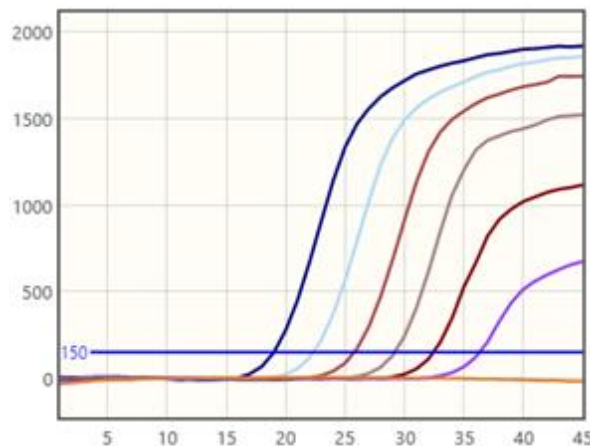


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



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/Germany/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.

ITALIANO

1. Uso previsto

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è un test RT-PCR in tempo reale automatico per l'identificazione qualitativa della mutazione P681R e della mutazione L452R dell'RNA del gene S in campioni di saliva e ottenuti con tampone nasofaringeo e orofaringeo positivi a SARS-CoV-2.

Il test è destinato a essere utilizzato con campioni positivi a SARS-CoV-2 quando il test viene eseguito insieme a VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Cod.: 444215) con campioni di pazienti con sospetta malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) dagli operatori sanitari (HCP).

Questo test è destinato a essere utilizzato come ausilio nel monitoraggio della prevalenza delle mutazioni P681R o L452R nel gene S e come ausilio nelle misure di controllo. Questo test utilizza il BD MAX™ System per l'estrazione automatica dell'RNA e la successiva real-time RT-PCR, utilizzando i reagenti forniti insieme ai reagenti universali e agli articoli monouso del BD MAX™ System. L'RNA viene estratto dai campioni e il DNA complementare (cDNA) viene sintetizzato e amplificato mediante RT-PCR e rilevato mediante sonde marcate con un colorante fluorescente specifico per le mutazioni P681R e L452R.

2. Introduzione e spiegazione

Tutti i virus, incluso SARS-CoV-2, mutano nel tempo. Alcune alterazioni possono influenzare le proprietà del virus, come ad esempio la facilità di diffusione, la gravità della malattia da esso causata o le prestazioni dei vaccini, delle terapie mediche, degli strumenti diagnostici e di altre misure sociali e di sanità pubblica.

La comparsa delle mutazioni genetiche è un evento naturale atteso nel processo evolutivo del virus. Infatti, alcune mutazioni specifiche definiscono i gruppi genetici virali che circolano al momento a livello globale. Inoltre, grazie al sequenziamento genetico del patogeno a livello mondiale, è stato possibile stabilire i pattern di dispersione e di evoluzione del virus.

Alla fine del 2020 la comparsa di varianti a elevato rischio per la salute pubblica ha sollecitato la caratterizzazione delle Variant of Interest (VOI) e delle Variant of Concern (VOC) per facilitare il controllo epidemiologico. Alcune di queste varianti di SARS-CoV-2 includono:

le varianti Delta (linea B.1.617.2) e Kappa (linea B.1.617.1) sono state strettamente associate ad un enorme aumento di dell'infezione da COVID-19 in India nella primavera 2021. La variante Delta ha diverse mutazioni nella proteina Spike, incluse P681R e L452R. Anche la variante Kappa ha alcune mutazioni genetiche nella proteina Spike, incluse P681R, L452R e E484Q.

Tutte queste mutazioni sopra descritte mostrano la capacità potenziale di neutralizzare alcune immunoterapie e di ridurre gli effetti attesi dei vaccini oppure sono state identificate come causa di una trasmissione nelle comunità.

Per questo motivo la comparsa di varianti che aumentano la trasmissibilità del virus e/o la sua virulenza e che sfuggono all'azione degli anticorpi neutralizzanti generati dopo l'infezione naturale o il vaccino costituisce un

problema di salute pubblica della massima importanza che può avere un impatto significativo sul controllo della pandemia.

Pertanto, VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato progettato per il rilevamento della principale mutazione associata alla variante sotto sorveglianza.

3. Principi del procedimento

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è progettato per il rilevamento qualitativo dell'RNA con mutazioni P681R e L452R nel gene *S* di SARS-CoV-2 in tamponi nasofaringei e orofaringei e campioni salivari positivi a SARS-CoV-2. Il rilevamento si esegue con un test real-time RT-PCR in un solo passaggio, in cui la trascrizione inversa e la successiva amplificazione della specifica sequenza target avvengono nella stessa provetta di reazione. L'RNA target isolato viene trascritto, generando un DNA complementare tramite la trascrittasi inversa, seguita dall'amplificazione di una regione conservata del gene *S* di SARS-CoV-2 per le mutazioni P681R e L452R utilizzando primer specifici e sonde marcate a fluorescenza.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un aumento del segnale fluorescente proporzionale alla quantità del DNA bersaglio. Questa fluorescenza viene misurata sul BD MAX™ System.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test real-time PCR (sonde/primer specifici, dNTP, tampone, polimerasi, trascrittasi inversa) in formato stabilizzato e un controllo interno endogeno per monitorare il processo di estrazione e/o l'inibizione dell'attività della polimerasi. Il test utilizza un gene costitutivo umano come controllo interno (CI) endogeno (*gene P dell'RNasi umana*). I geni costitutivi umani partecipano alla manutenzione di base delle cellule e, di conseguenza, si presume che siano presenti in tutte le cellule nucleate umane e che mantengano livelli di espressione relativamente costanti.

Target	Canale	Gene
Mutazione P681R	475/520	Gene <i>S</i>
Mutazione L452R	530/565	Gene <i>S</i>
Controllo interno (CI) endogeno	585/630	<i>Gene P dell'RNasi umana</i>

Tabella 1. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System include i materiali e i reagenti indicati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Colore o codice a barre	Quantità
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	Una miscela di enzimi, sonde/primer, tampone, dNTP, stabilizzatori e controllo interno endogeno in un formato stabilizzato	Sigillo blu	2 confezioni da 12 provette trasparenti
Rehydration Buffer tube	Soluzione per ricostituire il prodotto stabilizzato	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con N. di cat. VS-VAD124 (444218).

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Il seguente elenco include i materiali e gli strumenti richiesti per l'uso e che non sono inclusi nel VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Strumento per Real-time PCR: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.
- Opzionale: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Cod.: 444215)

6. Condizioni di trasporto e conservazione

- I kit possono essere spediti e conservati a 2-40 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 28 giorni.

7. Precauzioni per gli utenti

- Il prodotto è destinato all'uso esclusivamente da parte di utilizzatori professionali, come professionisti sanitari e tecnici di laboratorio, formati nell'impiego di tecniche di biologia molecolare.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.

- Chiudere la confezione protettiva dei reagenti con la cerniera subito dopo ogni utilizzo. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Non utilizzare reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Tenere i componenti lontano dalla luce.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che VIASURE SARS-CoV-2 *Variant II (P681R+L452R)* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il BD MAX™ System non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare abiti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare personal protective equipment (PPE) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità con il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kit non richiede una scheda dati sulla sicurezza (Safety Data Sheet) dei materiali a causa della sua classificazione come non pericoloso per la salute e per l'ambiente, perché non contiene sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione.
- Se il kit viene utilizzato insieme a VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Cod.: 444215), consultare le istruzioni per l'uso corrispondenti.
- Consultare il manuale utente del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.

8. Procedura del test

8.1. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stato testato su tamponi nasofaringei e campioni di saliva raccolti in mezzo di trasporto virale (VTM) – Vircell S.L. -; mezzo BD™ Universal Viral Transport (UVT) System – BD - o IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) - Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd e tamponi orofaringei raccolti in mezzo di trasporto virale (VTM) - Vircell. Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utente.

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utente. In generale, i campioni respiratori e salivari devono essere raccolti ed etichettati adeguatamente con o senza mezzo di trasporto (in base alla tipologia di campione) e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati tra i 2 e gli 8 °C entro le prime 72 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata (oltre 72 ore), raccomandiamo una spedizione a ≤-20 °C o a temperatura inferiore. È consigliato utilizzare campioni appena raccolti per il test. I campioni possono essere conservati da 2 a 8 °C a 72 ore oppure congelati a -20 °C o idealmente a -70 °C. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento dei campioni e degli acidi nucleici.

I tamponi nasofaringei/orofaringei e i campioni di saliva devono essere prelevati, trasportati e conservati in conformità alle linee guida di laboratorio appropriate. Per i dettagli, consultare le linee guida CDC (linee guida per la raccolta dei campioni). Sito web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e linee guida provvisorie per la raccolta, la manipolazione e l'analisi di campioni clinici di COVID-19. Sito web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> e le linee guida IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

8.2. Preparazione del campione ed estrazione dell'RNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni d'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3. Si prega di notare che altri tipi di campioni possono richiedere un pretrattamento. Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utente.

Quando si utilizzano campioni nasofaringei o orofaringei:

1. Pipettare 400-750 µl di campione nasofaringeo o orofaringeo raccolto in un mezzo di trasporto virale (VTM) o in un mezzo BD™ Universal Viral Transport (UVT) System o IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

In caso di utilizzo di campioni di saliva raccolti in mezzo di trasporto:

1. I campioni di saliva possono essere raccolti nel mezzo di trasporto virale (VTM), nel BD™ Universal Viral Transport (UVT) o nell'IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) con un rapporto di 1:3 (saliva:mezzo). Miscelare con un vortex per 1 minuto a velocità elevata. Pipettare 750 µl di campione in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

In caso di utilizzo di campioni di saliva puri:

1. Unire la saliva al mezzo di trasporto virale (VTM), al BD™ Universal Viral Transport (UVT) o all'IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) in modo da ottenere un rapporto finale tra la saliva e il mezzo di 1:3. Miscelare con un vortex per 1 minuto a velocità elevata. Pipettare 750 µl di campione in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Assicurarsi una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con il BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utente del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creazione di un programma di test PCR per VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: se è stato già creato il test per VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 e passare direttamente all'8.3.2.

- 1) Sulla schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Cliccare sul pulsante "Create" (Crea).
- 3) Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base), nella finestra "Test Name" (Nome test), nominare il proprio test: VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R).
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: il prodotto può essere utilizzato insieme a VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Cod.: 444215), quindi selezionare "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5).
- 6) In "Sample extraction parameters" (Parametri di estrazione campione) selezionare "User defined" (Definito dall'utente) e regolare il volume del campione a 950 µl.
- 7) In "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite).
- 8) Se si utilizza un software versione 5.00 o superiore, in "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) scegliere la seguente configurazione:

- a. "Snap-In 2 Barcode" (Codice a barre Snap-In 2): lasciare vuoto (per la SARS-CoV-2 *Variant II* (P681R+L452R) reaction tube non è necessaria la configurazione del codice a barre).
- b. "Snap-In 3 Barcode" (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per la Rehydration Buffer tube)
- c. "Snap-In 4 Barcode" (Codice a barre Snap-In 4): 1G se utilizzato insieme alla provetta di reazione SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube e formato "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1).
- 9) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri: "Channel Settings" (Impostazioni canale), "Gains" (Guadagni) e "Threshold" (Limite) (Tabella 3).
- a. Nota: il prodotto può essere utilizzato insieme a VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Cod.: 444215), "PCR Settings" (Impostazioni PCR) e "Test Steps" (Passaggi test) devono essere completati per la posizione Snap-In 4 (blu) (vedere le istruzioni per l'uso corrispondenti).

Channel (Canale)	Alias (Alias)	Gain (Guadagno)	Threshold (Soglia)	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

Tabella 3. "PCR settings" (Impostazioni di PCR).

Nota: si consiglia di impostare i valori minimi della soglia sopraelencati per ciascun canale come punto di partenza; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

- 10) Nella scheda "PCR settings" (Impostazioni di PCR) inserire anche i seguenti parametri "Spectral Cross Talk" (Cross talk spettrale) (Tabella 4):

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitazione)	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	-	

Tabella 4. Parametri "Spectral cross-talk" (Cross-talk spettrale).

- 11) Nella scheda "Test Steps" (Fasi test), inserire il protocollo PCR (Tabella 5).

Step Name (Nome fase)	Profile Type (Tipo profilo)	Cycles (Cicli)	Time (s) (Tempo(s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Rilevazione)
Reverse transcription (Trascrizione inversa)	In attesa	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	In attesa	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e allineamento/Estensione (Raccolta dati))	Temperatura 2	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

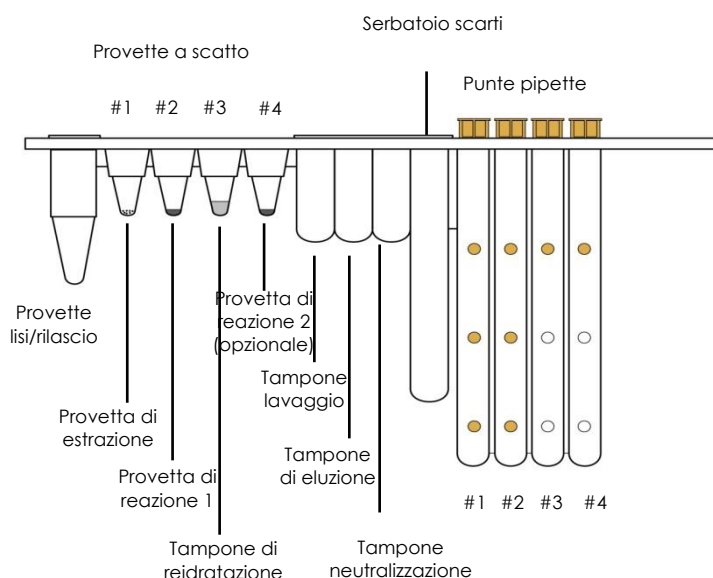
Tabella 5. Protocollo PCR.

12) Cliccare sul tasto "Save Test" (Salva test).

8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizionarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare la(e) provetta(e) di estrazione (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube (sigillo blu) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
 - i. Nota: se si sceglie il formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (MM liofilizzato concentrato Master Mix duale con tampone di reidratazione - Tipo 5) (paragrafo 8.3.1), determinare e separare il numero appropriato di provette di reazione SARS-CoV-2 aggiuntive (sigillo 1G nel caso di VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 4, codifica di colore blu sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tube (sigillo 11) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - a. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. Striscia di reagente (TNA) BD MAX™ TNA del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Work List" (Lista di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software del BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) (se non è ancora stato creato, vedere paragrafo 8.3.1).
- 3) Selezionare il numero relativo al lotto del kit (si trova sulla confezione esterna del kit di estrazione utilizzato) dal menu a tendina (opzionale).
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nella finestra "Sample tube" (Provetta campione) dalla "Work List" (Lista di lavoro), manualmente oppure scansionando il codice a barre.
- 5) Compilare il codice "Specimen/Patient" (campione/paziente) e/o la finestra "Accession" (Ingresso) nella "Work List" (Lista di lavoro) e cliccare sul pulsante "Save" (Salva). Continuare fino all'inserimento di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che il codice campione/paziente e le Sample Buffer Tube corrispondano.
- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulle BD MAX™ Rack(s).
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridges nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Cliccare "Start Run" (Inizia operazione) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report BD MAX™

- 1) Nel menu principale, cliccare sul pulsante "Results" (Risultati).
- 2) Cliccare due volte sul test in corso nella lista oppure premere il pulsante "View" (Vedi).
- 3) Cliccare su "Print" (Stampa), selezionare: "Run Details, Test Details and Plot..." (Dettagli operazione, dettagli test e grafico...)
- 4) Cliccare su "Print or Export button" (Stampa o esporta) nella schermata "Run Reports" (Esegui report).

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L'analisi di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è destinata a essere eseguita come reflex su campioni con un risultato positivo all'RNA di SARS-CoV-2. Se viene utilizzato insieme a VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System su campioni con stato non noto rispetto alla presenza dell'RNA di SARS-CoV-2, consultare le relative istruzioni per l'uso per l'interpretazione dei risultati per la determinazione del risultato relativo all'RNA di SARS-CoV-2.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del sistema BD MAX™ riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 3). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a 0 deve essere controllata manualmente.
- Valore di Ct pari a -1: non si è verificato nessun processo di amplificazione.
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e nel rispetto delle linee guida di interpretazione del campione riportate nella Tabella 6.

Controllare l'emissione del segnale di controllo interno per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, controllare che non sia presente nessun guasto al BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

Target mutazione P681R (475/520)	Target mutazione L452R (530/565)	Controllo interno endogeno (585/630)	Interpretazione
+	-	+/- ¹	Mutazione P681R rilevata¹
-	+	+/- ¹	Mutazione L452R rilevata¹
+	+	+/- ¹	Mutazione P681R e mutazione L452R rilevate¹
-	-	+ ¹	Mutazione P681R e mutazione L452R non rilevate¹
-	-	- ²	Un risultato non risolto (UNR) ottenuto in presenza di inibitori nella reazione PCR o quando si verifica un problema generale (non segnalato da un codice di errore) con le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione.²
IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di guasto dello strumento collegato ad un codice di errore.
INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test.

Tabella 6. Interpretazione del campione.

+: Curva di amplificazione presente.

-: Senza curva di amplificazione.

1 Un campione viene considerato positivo se il valore ottenuto di Ct è inferiore a 40. Il controllo interno endogeno (CI) a volte può non mostrare un segnale di amplificazione. A volte il rilevamento del CI non è necessario perché la presenza di un elevato numero di copie del target può provocare l'amplificazione preferenziale di acidi nucleici target-specifici.

2 Qualora i siti target delle mutazioni P681R e L452R fossero negativi, il CI deve mostrare un segnale di amplificazione con un Ct inferiore a 35. Il valore di Ct può essere estremamente variabile poiché il controllo interno endogeno è un gene costitutivo umano che dovrebbe essere presente in tutte le cellule enucleate umane del campione originale. Qualora il segnale fosse assente o vi fosse un valore di Ct ≥ 35 del controllo interno endogeno, il risultato viene considerato come "non risolto" ed è necessario ripetere il test.

Riepilogo delle mutazioni associate alle seguenti linee presenti nelle Variant of Concern (VOC) più note:

Linee	Nome OMS	Mutazione nel gene S ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

Tabella 7. Riepilogo delle mutazioni associate alle Variant of Concern (VOC) note.

¹Tracciamento delle varianti di SARS-CoV-2: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (dati fino al 2 settembre 2021).

²Panoramica delle varianti/mutazioni <https://covariants.org/variants> (dati fino a 2 settembre 2021).

Altre varianti possono presentare le mutazioni P681R e L452R perché queste mutazioni non sono specifiche delle varianti menzionate.

L'assegnazione finale a una linea deve essere eseguita mediante il sequenziamento.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utente, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test RT-qPCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Nonostante questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato convalidato con tamponi nasofaringei/orofaringei e campioni di saliva.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.

- La qualità del test dipende dalla qualità del campione: gli acidi nucleici devono essere estratti in modo appropriato da campioni respiratori.
- Questo test è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti.
- Possono essere rilevati livelli estremamente bassi al di sotto del limite di rilevamento, ma i risultati non possono essere riproducibili.
- I campioni con valore di Ct tra 35 e 40 possono mostrare una maggiore variabilità dei risultati ottenuti.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione crociata dell'RNA di SARS-CoV-2 con le mutazioni P681R o L452R nel gene S quando i campioni contengono concentrazioni elevate di RNA target oppure per la contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Le combinazioni dei primer e delle sonde specifiche per l'identificazione delle mutazioni P681R o L452R usate nel VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System non mostrano omologie combinate significative con il genoma umano, la microflora umana o altri coronavirus, rendendo prevedibili i falsi positivi.
- I risultati falsi negativi possono essere dovuti a diversi fattori e a combinazioni di essi; questi includono:
 - Metodi di prelievo, trasporto, considerazione e/o manipolazione dei campioni non corretto.
 - Procedure di preparazione incorrette (inclusa l'estrazione di RNA).
 - Degradazione dell'RNA virale durante l'invio/la conservazione e/o la preparazione dei campioni.
 - Le mutazioni o il polimorfismo del primer o delle regioni di legame della sonda possono influenzare il rilevamento di nuove varianti o di varianti sconosciute del SARS-CoV-2.
 - Carica virale del campione al di sotto del limite di rilevamento del dosaggio.
 - Presenza di inibitori della RT-qPCR o di altri tipi di sostanze interferenze. L'impatto di vaccini, farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o farmaci immunosoppressori utilizzati per prevenire il COVID-19 o utilizzati durante il trattamento dell'infezione non è stato valutato.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura per il test.
- Alcuni campioni possono non mostrare curve di amplificazione dell'*RNasi P* a causa del basso numero di cellule umane nel campione clinico originale. Un segnale negativo del controllo interno non esclude la presenza delle mutazioni P681R o L452R in un campione clinico.
- Il risultato positivo di un test non indica necessariamente la presenza di virus vivo e non implica che il virus sia infettivo o che sia l'agente eziologico dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza di sequenze virali target.
- La presenza delle mutazioni P681R o L452R è associata alle varianti Kappa (linea B.1.617.1) e Delta (linea B.1.617.2); tuttavia, l'assegnazione finale a una linea deve essere effettuata tramite sequenziamento.
- I risultati negativi non escludono la presenza dell'RNA di SARS-CoV-2 poiché questo test è destinato all'uso con campioni positivi a SARS-CoV-2.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contiene un controllo interno endogeno (CI) in ogni provetta di reazione, che conferma la corretta esecuzione della tecnica.

12. Caratteristiche del test

12.1. Sensibilità e specificità clinica

Le prestazioni cliniche di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono state testate utilizzando campioni clinici (tamponi nasofaringei) già caratterizzati come positivi o negativi per SARS-CoV-2 prelevati da pazienti. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	CerTest Biotec S.L (Saragozza, Spagna)	tampone nasofaringeo	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Mutazione P681R Mutazione L452R

Tabella 8. Sede, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori positivi e negativi reali, i valori falsi positivi e falsi negativi, la sensibilità e la specificità di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto, come riportato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
1	Test molecolare TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit + sequenziamento	Mutazione P681R	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100% (95 – 100)
		Mutazione L452R	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

Tabella 9. Valori positivi (TP) e negativi reali (TN), valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità per VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Per valutare la compatibilità di diversi matrici di campioni (tampone nasofaringeo, tampone orofaringeo e tampone nasofaringeo/orofaringeo in mezzo di trasporto virale (VTM) di Vircell), è stato condotto uno studio sulla compatibilità. I risultati ottenuti hanno mostrato che le tre diverse matrici di campioni erano compatibili con VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Inoltre, sono state valutate le prestazioni cliniche provvisorie di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con campioni di saliva. Sono stati analizzati singoli campioni di saliva negativi addizionati con una concentrazione nota di frammento di cDNA sintetico per le mutazioni P681R e L452R nel gene S appartenente a SARS-CoV-2. La valutazione è stata condotta su 20 campioni positivi (10 campioni 2xLoD e 10 campioni 10xLoD) e 10 campioni negativi. Il test è stato eseguito utilizzando un volume di campione di 750 µl di ciascuna condizione aggiunta al Sample Buffer Tube (SBT) del TNA-3 Extraction Kit ed è stato condotto in piena modalità operativa (estrazione automatizzata e amplificazione PCR) utilizzando BD MAX™ ExK™ TNA-3.

La percentuale di concordanza è stata calcolata in relazione al risultato atteso per ciascun campione individuale e i risultati sono stati riportati nella seguente tabella.

Campione di saliva	Concordanza
Campioni positivi	95%
Campioni negativi	100%

Tabella 10. Percentuale di concordanza di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System con campioni di saliva.

Inoltre, è stata condotta un'analisi comparativa su tamponi nasofaringei e campioni di saliva per valutare le prestazioni cliniche di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System su campioni di saliva. Sono stati analizzati e confrontati 7 campioni di saliva con i loro corrispondenti campioni nasofaringei osservando una concordanza del 100%. Entrambe le mutazioni US (P681R e L452R) sono state rilevate nei sei campioni di saliva caratterizzate come variante Delta.

Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità
Mutazione P681R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.d.*
Mutazione L452R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.d.*

Tabella 11. Valori positivi (TP) e negativi reali (TN), valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità per VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*A causa della limitata disponibilità di campioni negativi, non è stato possibile eseguire il calcolo della specificità clinica del test.

In conclusione, i campioni di saliva erano compatibili con VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

I risultati mostrano una concordanza nel rilevare limitazioni P681R e L452R utilizzando VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilità analitica

I risultati del limite di rilevamento (LoD) con un tasso di positività $\geq 95\%$ di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System sono i seguenti:

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System presenta un limite di rilevamento (LoD) ≥ 40 RNA copie/reazione su campioni nasofaringei ≥ 250 RNA copie/reazione su campioni di saliva per la mutazione P681R.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System presenta un limite di rilevamento (LoD) ≥ 40 RNA copie/reazione su campioni nasofaringei e ≥ 500 RNA copie/reazione su campioni salivari per la mutazione L452R.

Figura 2. Serie di diluizioni di SARS-CoV-2 variante II (mutazione P681R) (cDNA sintetico) ($5,3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ copie per reazione) eseguita su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

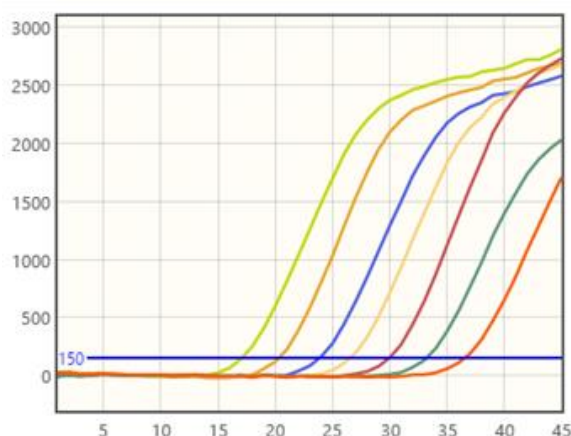
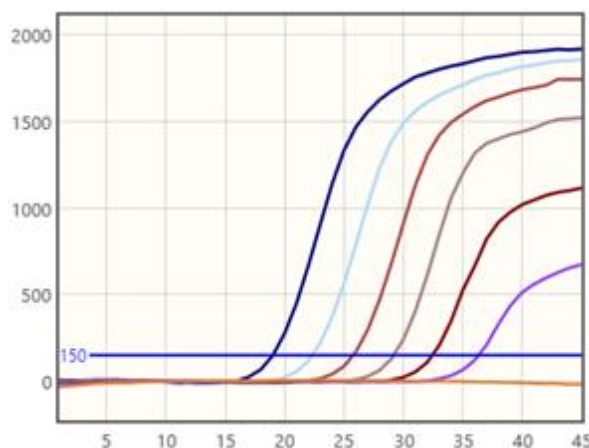


Figura 3. Serie di diluizioni di SARS-CoV-2 variante II (mutazione L452R) (cDNA sintetico) ($5,3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ copie per reazione) eseguita su BD MAX™ System (canale 530/565 (HEX)).



12.3. Specificità analitica

La specificità del test SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) è stata confermata testando un pannello formato da diversi microorganismi che rappresentano i più comuni patogeni respiratori. Non è stata rilevata alcuna reattività incrociata tra i seguenti microrganismi testati:

Test di reattività incrociata				
Adenovirus umano sierotipi 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1) pdm09	-	Virus parainfluenzali umani 1, 2, 3 e 4
Bocavirus	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Pneumocystis jirovecii tipo A1 e g885652
Bordetella bronchiseptica	-	Virus influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Rhinovirus umano
Bordetella holmesii	-	Virus dell'Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Virus respiratorio sinciziale (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

Test di reattività incrociata					
Chlamydia caviae	-	Virus dell'Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Streptococcus pyogenes	-
Chlamydia psittaci genotipo A e C	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	SARS Coronavirus ceppo Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	2019-nCoV umano ceppo BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Coronavirus umani 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	2019-nCoV umano ceppo 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
Coronavirus MERS	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (virus SARS-CoV-2 isolato Australia/VIC01/2020)*	-
Enterovirus Cocksackievirus A24, A9 e B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (virus SARS-CoV-2 isolato Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	Virus SARS-CoV-2 ceppo 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*	-
Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Metapneumovirus umano A e B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	SARS-CoV-2 linea B.1.1.7_710528 e SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 (variante Alpha)*	-
Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09	-	Mycoplasma pneumoniae	-	SARS-CoV-2 linea B.1.351 (variante Beta)*	-
Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-	SARS-CoV-2 linea P.1 (variante Gamma)*	-

Tabella 12. Microrganismi patogeni di riferimento utilizzati in questo studio.

* Notare che il rilevamento di questi ceppi di SARS-CoV-2 non è preso in considerazione in questo test. Questo test è progettato per il rilevamento qualitativo delle mutazioni P681R e L452R nel gene S in diverse varianti di SARS-CoV-2.

12.4. Reattività analitica










La reattività di VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System è stata valutata in relazione a controlli di RNA sintetico della variante Kappa (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021) e a campioni clinici caratterizzati come variante Delta (B.1.617.2) mediante sequenziamento, mostrando risultati positivi.

Bibliography/Bibliografia

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed June 2021.
4. Chen N. *et al.*. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed June 2021.
7. Lu R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed August 2021.
10. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed June 2021.
11. Yan Y *et al.* Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
12. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed June 2021.
13. Chu D.K.W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
14. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed June 2021.
16. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
17. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
18. Sheikh A. *et al.* Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.

19. World Health Organization. Public health surveillance for COVID-19. 16 December 2020. Available from [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)) Accessed June 2021.
20. Enfermedad por coronavirus, COVID-19, Información Científica-técnica. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, España. 01-2021.
21. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Emerging SARS-CoV-2 Variants. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html> Accessed June 2021.
22. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html> Accessed August 2021.

Symbols for IVD components and reagents/Simboli per reagenti e componenti IVD

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i> .	 Keep dry Mantenere asciutto	 Use by Usare entro	 Manufacturer Produttore	 LOT	Batch code (Lot) Codice lotto	
 i	Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso	 Temperature limitation Limitazione temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contenuto sufficiente per <n> test	DIL	Sample diluent Diluente	 REF	Catalog number Numero di catalogo

Trademarks

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

Change Control / Controllo modifiche		
Version No. / N. versione	Changes / Modifiche	Date / Data
00	Original version / Versione originale.	8/10/2021

Table A 2. Control change table/ Tabella di controllo delle modifiche.

Revision: 8 Ottobre 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

