

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 / Denne bruksanvisningen gjelder for følgende referanse:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERANSE
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. / Referanse for produkt som skal brukes med 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

Innhold

1.	Tiltenkt bruk	20
2.	Sammendrag og forklaring	20
3.	Grunnleggende prosedyre	21
4.	Reagenser som følger med.....	21
5.	Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren	22
6.	Transport- og lagringsforhold	22
7.	Forholdsregler for brukere.....	22
8.	Testprosedyre.....	23
8.1.	Innsamling, oppbevaring og transport av prøver.....	23
8.2.	Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon.....	24
8.3.	PCR-protokoll	25

9.	Tolkning av resultater	28
10.	Testens begrensninger	30
11.	Kvalitetskontroll	31
12.	Ytelsesegenskaper	31
12.1.	Klinisk sensitivitet og spesifisitet	31
12.2.	Analytisk sensitivitet	33
12.3.	Analytisk spesifisitet	34
12.4.	Analytisk reaktivitet	35
	Bibliography/ Litteratur	36
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser.....	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.

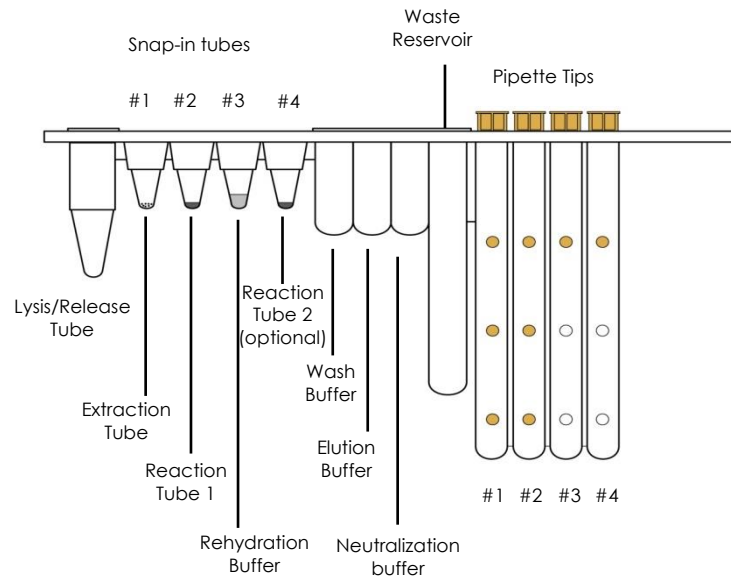
- 12) Click the "Save Test" button.

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).

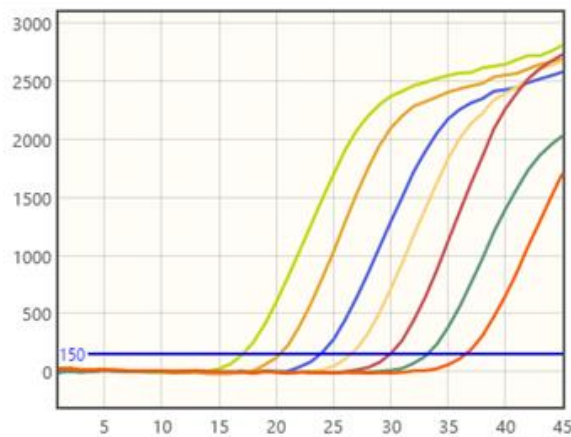
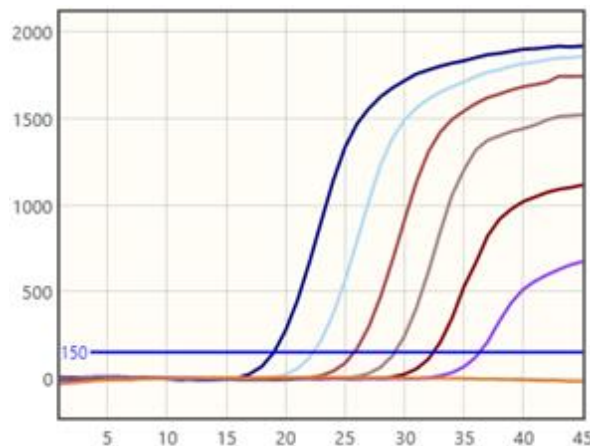


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



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/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.

NORSK

1. Tiltent bruk

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er en automatisert RT-PCR-test i sanntid designet for kvalitativ påvisning av P681R-mutasjon og L452R-mutasjon i S-genet RNA fra positive SARS-CoV-2 nasofaryngeale og orofaryngeale prøvempensler og spyttprøver.

Analysen er ment for bruk med positive prøver for SARS-CoV-2 eller, hvis testen utføres sammen med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215) med prøver fra pasienter som mistenkes å være positive for Coronavirus 2019 (COVID-19) av deres helseprofesjonell.

Denne testen er ment som en hjelp i overvåking av prevalensen av P681R eller L452R-mutasjoner i S-genet, og som en hjelp i kontrolliltak. Analysen bruker BD MAX™ System til automatisert ekstraksjon av RNA og påfølgende sanntids RT-PCR ved bruk av de medfølgende reagensene kombinert med universale reagenser og forbruksmaterieell for BD MAX™-systemet. RNA ekstraheres fra prøver, og komplementært DNA (cDNA) syntetiseres og forsterkes ved bruk av RT-PCR og påvises ved hjelp av fluorescerende reporterfargeprober som er spesifikke for P681R- og L452R-mutasjoner.

2. Sammendrag og forklaring

Alle viruser, inkludert SARS-CoV-2, muterer over tid. Enkelte endringer kan påvirke viruset egenskaper, slik som hvor lett det sprer seg, alvorlighetsgraden av den assosierte sykdommen, eller ytelsen til vaksiner, terapeutiske medisiner, diagnostiske verktøy eller andre helsemessige eller sosiale midler.

At mutasjoner dukker opp er en naturlig og forventet hendelse i evolusjonsprosessen til et virus. Faktisk definerer enkelte spesifikke mutasjoner de virale gengrupperne som sirkulerer globalt på nåværende tidspunkt. Takket være genetisk sekvensering av patogenet verden over har det vært mulig å fastslå mønstre for virusets spredning og evolusjon.

Ved slutten av 2020 ansporet utviklingen av varianter som representerte en høyere risiko for offentlig helse, karakteriseringen variants of interest (VOI) og Variants of Concern (VOC), for å tilrettelegge for epidemiologisk kontroll. Noen av disse variantene av SARS-CoV-2 er:

Variantene Delta (B.1.617.2-linjen) og Kappa (B.1.617.1-linjen) ble nært assosiert med en voldsom økning av COVID-19 i India våren 2021. Delta-varianten har multiple mutasjoner i spikeproteinet, inkludert P681R og L452R. Kappa-varianten har også genetiske mutasjoner i spikeproteinet, inkludert P681R, L452R og E484Q.

Alle mutasjonene beskrevet ovenfor viser en potensiell reduksjon i nøytralisering av enkelte immunterapier, og reduksjon av forventede effekter av vaksiner har blitt identifisert til å forårsake overføring i samfunnet.

At det dukker opp varianter som øker overføring av viruset, dets virulens eller som unnslipper virkningen av nøytraliserende antistoffer som dannes etter naturlig infeksjon eller vaksine, utgjør derfor et svært viktig offentlig helseproblem som kan ha en stor innvirkning på kontrollen av pandemien.

Av denne grunnen har VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System blitt utformet for å muliggjøre sporing av hovedmutasjonen som er assosiert med varianten under overvåkning.

3. Grunnleggende prosedyre

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er designet for kvalitativ påvisning av RNA med P681R- og L452R-mutasjoner i S-genet fra SARS-CoV-2 fra positive nasofaryngeale og orofaryngeale prøvepensler og spyttprøver. Påvisningen utføres i ettrinns, sanntids RT-PCR-format, der revers transkripsjon og påfølgende amplifikasjon av den spesifikke målsekvensen skjer i samme reaksjonsrør. Det isolerte RNA-målet transkriberes og genererer komplementært DNA via revers transkriptase. Deretter amplifiseres et konservert område av S-genet for SARS-CoV-2 for P681R-mutasjon og L452R-mutasjon ved hjelp av spesifikke primere og fluorescensmerkede prober.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er basert på 5'-eksonuklease-aktiviteten til DNA-polymerase. Under DNA-amplifikasjon kløver dette enzymet proben som er bundet til den komplementære DNA-sekvensen, og skiller quencher-fargen fra reporterfargen. Denne reaksjonen genererer en økning i fluorescenssignalet som er proporsjonal med kvantiteten av måltemplatet. Denne fluorescensen måles av BD MAX™ System.

Hvert rør i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder alle komponenter som behøves for sanntids PCR-analyse (spesifikke primere/prober, dNTP-er, buffer, polymerase og revers transkriptase) i et stabilisert format, samt en endogen intern kontroll til monitorering av ekstraksjonsprosessen og/eller hemming av polymeraseaktiviteten. Analysen benytter et humant housekeeping-gen som endogen intern kontroll (IC) (humant RNase P-gen). Humane housekeeping-gener er involvert i grunnleggende cellevedlikehold og er derfor forventet å være til stede i alle nukleære humane celler og opprettholde relativt konstante genuttrykksnivå.

Mål	Kanal	Gen
P681R-mutasjon	475/520	S-gen
L452R-mutasjon	530/565	S-gen
Endogen intern kontroll (IC)	585/630	humant RNase P-gen

Tabell 1. Mål, kanal og gener.

4. Reagenser som følger med

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderer følgende materialer og reaganer, nærmere beskrevet i tabell 1:

Reagens/materiale	Beskrivelse	Farge eller strekkode	Mengde
SARS-CoV-2 variant II (P681R+L452R) reaction tube	En blanding av enzymer, primere, prober, buffer, dNTP-er, stabilisatorer og endogen intern kontroll i et stabilisert format	Blå folie	2 poser à 12 blanke rør
Rehydration Buffer tube	Løsning til rekonstituering av det stabiliserte produktet	11-folie	1 poser à 24 blanke rør

Tabell 2. Reagenser og materialer som følger med i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med katalognummer VS-VAD124 (444218).

5. Reagenser og utstyr som må skaffes av brukeren

Følgende liste inneholder materialene og utstyret som kreves til bruken, men som ikke er inkludert i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Sanntids PCR-instrument: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (ref:442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipetter (nøyaktighet mellom 2 og 1000 µl)
- Filterspisser
- Pudderfrie engangshansker.
- Valgfritt: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215)

6. Transport- og lagringsforhold

- Settene kan sendes og oppbevares ved 2–40 °C inntil utløpsdatoen som er angitt på etiketten.
- Etter åpning av aluminiumsposene med reaksjonsrørene kan produktet brukes i opptil 28 dager.

7. Forholdsregler for brukere

- Produktet er kun ment å brukes av fagpersonell, f.eks. laboratorie- eller helsepersonell og teknikere, som er opplært i molekylære biologiske teknikker.
- Til diagnostisk bruk *in vitro*.
- Ikke bruk reagenser og/eller materialer som er gått ut på dato.
- Ikke bruk settet hvis etiketten som forseglar ytteresken er brutt.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesesken er åpen eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis beskyttelsesposene er åpne eller revnet ved levering.
- Ikke bruk reagenser hvis reagensposene ikke har tørkemiddel eller hvis tørkemiddelet er ødelagt.
- Ikke fjern tørkemiddelet fra reagensposene.
- Beskyttelsesposene til reagensene skal lukkes med lynlåsen umiddelbart etter hver bruk. Fjern all overflødig luft i posene før de forsegles.

- Må ikke brukes hvis folien er revnet eller ødelagt.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige poser og/eller sett og/eller loter.
- Beskytt reagenser fra fuktighet. Langvarig eksponering for fuktighet kan påvirke produktytelsen.
- Oppbevar komponentene beskyttet mot lys.
- I tilfeller der andre PCR-tester utføres i det samme generelle området av laboratoriet, må det utvises forsiktighet for å unngå kontaminering av VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, ekstraksjonssettet BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, eventuelle andre reagenser som kreves for testing samt BD MAX™ System. Unngå alltid at reagenser kontamineres med mikrober og ribonuklease (RNase)/deoksyribonuklease (DNase). Det anbefales bruk av sterile RNase/DNase-frie aerosolresistente eller "positive displacement" pipettespisser til engangsbruk. Bruk en ny pipettespiss for hver prøve. Du må skifte hansker før du håndterer reagenser og kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- For å unngå miljøkontaminering med amplikoner må du ikke brette åpen BD MAX™ PCR Cartridge etter bruk. Forseglingene på BD MAX™ PCR Cartridge er designet for å unngå kontaminering.
- Benytt en enveis arbeidsflyt. Den skal starte i ekstraksjonsområdet og deretter gå videre til amplifikasjons- og påvisningsområdet. Prøver, utstyr og reagenser må ikke returneres til området der det forrige trinnet ble utført.
- Følg god laboratoriepraksis. Bruk verneklær, engangshansker, vernebriller og maske. Ikke spis, drikk, røyk eller påfør kosmetiske produkter i arbeidsområdet. Vask hendene når testen er utført.
- Prøvene må behandles som potensielt smittefarlige og/eller biologisk farlige, i likhet med alle reagenser og materialer som har blitt eksponert for prøvene, og de må håndteres i henhold til nasjonale sikkerhetsregler. Ta nødvendige forholdsregler under innsamling, oppbevaring, håndtering og kassering av prøver.
- Prøver og reagenser må håndteres i et biologisk sikkerhetsskap. Bruk personlig verneutstyr (PU) i tråd med de relevante retningslinjene for håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Avfall skal kastes i henhold til lokale og delstatlige forskrifter.
- Regelmessig dekontaminering av annet vanlig utstyr som brukes er anbefalt, spesielt mikropipetter og arbeidsflater.
- I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 (REACH), kreves det ikke sikkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) for VIASURE Real Time PCR Detection Kits ettersom de er klassifisert som ikke helse- eller miljøskadelige fordi de ikke inneholder farlige stoffer og/eller blandinger som oppfyller fareklassifiseringskriteriene tilgjengelig i forordning (EF) nr. 1272/2008 (CLP), eller som har konsentrasjoner høyere enn verdien fastsatt i nevnte forordning i sin deklarasjon.
- Hvis settet brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), referer til den gjeldende bruksanvisningen.
- Konsulter brukerhåndboken for BD MAX™ System for ytterligere advarsler, forsiktighetsregler og prosedyrer.

8. Testprosedyre

8.1. Innsamling, oppbevaring og transport av prøver

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har blitt testet på nasofaryngeale prøvepensler og spyttprøver, begge samlet inn i virustransportmedium (VTM) – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD – eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) –

Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd og orofaryngeale prøvepensler samlet inn i virustransportmedium (VTM) – Vircell. Andre typer prøver må valideres av brukeren.

Innsamling, oppbevaring og transport av prøver skal utføres under de forhold som valideres av brukeren. Generelt skal luftveisprøver og spyttprøver samles inn og merkes på egnet måte i rene beholdere med eller uten transportmedium (avhengig av prøvetypen) og behandles snarest mulig for å garantere kvaliteten av testen. Prøvene skal transporteres ved 2 til 8 °C i opptil 72 timer, i henhold til lokale og nasjonale regler for transport av patogen materiale. For langvarig transport (over 72 timer) anbefaler vi forsendelse ved ≤-20 °C eller lavere. Det anbefales å bruke ferske prøver til testen. Prøvene kan oppbevares ved 2 til 8 °C i opptil 72 timer eller fryses ved -20 °C eller ideelt sett ved -70 °C for konservering. Gjentatte sykluser med frysing/tinging bør unngås for å forhindre forringelse av prøven og nukleinsyrene.

Nasofaryngeale/orofaryngeale prøver og spyttprøver skal samles inn, transporteres og oppbevares i tråd med relevante retningslinjer for laboratoriet. For mer informasjon, se retningslinjene til CDC (Specimen collection guidelines), nettstedet <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> og midlertidige retningslinjer for innsamling, håndtering og testing av kliniske prøver for COVID-19 nettstedet <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> og IDSA's retningslinjer (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018), og artikkelen 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. Klargjøring av prøver og RNA-ekstraksjon

Klargjør prøven i henhold til anbefalingene i bruksanvisningen for ekstraksjonssettet som brukes; BD MAX™ ExK™ TNA-3. Merk at enkelte andre prøver kan kreve forbehandling. Prosedyrer for klargjøring til ekstraksjon i samsvar med den spesifikke anvendelsen skal utvikles og valideres av brukeren.

Ved bruk av nasofaryngeale og orofaryngeale prøver:

1. Pipettér mellom 400 og 750 µl av den nasofaryngeale eller orofaryngeale prøvepenselen samlet inn i virustransportmediumet (VTM) eller i BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 prøvebufferør og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

Ved bruk av spyttprøver samlet inn i transportmedium:

1. Spyttprøver kan samles inn i virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) med et forhold på 1:3 (spytt:medium). Kjør i virvelblander på høy hastighet i ett minutt. Pipettér 750 µl ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube og lukk røret med en membranhet. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

Ved bruk av rene spyttprøver:

1. Kombiner spytt med virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) slik at det endelige forholdet er 1:3 (spytt:medium). Kjør i virvelblander på høy

hastighet i ett minutt. Pipettér deretter 750 µl ned i et BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube og lukk røret med en membranhette. Pass på å blande godt ved å bruke virvelblanding med høy hastighet i 1 minutt. Fortsett til betjening av BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR-protokoll

Merk: Se brukerhåndboken for BD MAX™ System for detaljerte instruksjoner.

8.3.1. Opprette PCR-testprogram for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Merk: Hvis du allerede har opprettet testen for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, kan du hoppe over trinn 8.3.1 og gå direkte til 8.3.2.

- 1) Velg fanen "Test Editor" (Testredigering) på skjermbildet "Run" (Kjør) på BD MAX™ System.
- 2) Klikk på knappen "Create" (Opprett).
- 3) Skriv navnet på testen din i fanen "Basic Information" (Grunnleggende info), i vinduet "Test Name" (Testens navn): f.eks. VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R).
- 4) Fra nedtrekksmenyen "Extraction Type" (Ekstraksjonstype), velg "ExK TNA-3".
- 5) Fra nedtrekksmenyen "Master Mix Format", velg "Type 5".
 - a. Merk: Settet kan brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), velg deretter "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)).
- 6) Under "Sample extraction parameters" (Prøveekstraksjonsparametere), velg "User defined" (Brukerdefinert) og tilpass prøvevolumet til 950 µl.
- 7) Under "Ct Calculation" (Ct-beregning), velg "Call Ct at Threshold Crossing" (Angi Ct ved terskelkryssing).
- 8) Hvis du kjører versjon 5.00 av programvaren, velger du følgende konfigurasjon under "Custom Barcodes" (Egendefinerte strekkoder):
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Strekkode for Snap-In 2): la stå tom (ingen strekkodekonfigurasjon behøves for SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube)
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Strekkode for Snap-In 3): 11 (vedrørende Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Strekkode for Snap-In 4): 1G hvis brukt i kombinasjon med SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube (reaksjonsrør) og formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1).
- 9) Oppgi følgende parametere i fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger): "Channel Settings" (Kanalinnstillinger), "Gains" (Forsterkning) og "Threshold" (Terskel) (tabell 3).

- a. Merk: Produktet kan brukes i kombinasjon med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), "PCR Settings" (PCR-innstillinger) og "Test Steps" (Testtrinn) skal fylles ut for posisjon 4 (blå) (se gjeldende bruksanvisning).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Forsterkning)	Threshold (Terskel)	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)	IC	80	150	0	35
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabell 3. "PCR Settings" (PCR-innstillinger).

Merk: Det anbefales at man først stiller inn minimum terskelverdiene som er listet opp ovenfor for hver kanal, men de endelige innstillingene må bestemmes av sluttbrukeren under tolkningen av resultatene for å sikre at tersklene faller innenfor den eksponentielle fasen av fluorescenskurvene og over et eventuelt bakgrunnssignal. Terskelverdien for forskjellige instrumenter kan variere grunnet forskjellige signalintensiteter.

- 10) I fanen "PCR settings" (PCR-innstillinger) oppgir du i tillegg følgende parametere "Spectral Cross Talk" (Spektral krysstale) (tabell 4)

		False Receiving Channel (Kanal som mottar falske data)				
Channel (Kanal)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Eksitasjonskanal)	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	-

Tabell 4. Parametere for "Spectral Cross Talk" (spektral krysstale).

- 11) I fanen "Test Steps" (Testtrinn) oppgir du PCR-protokollen (tabell 5).

Step Name (Navn på trinn)	Profile Type (Profiltype)	Cycles (Sykluser)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Påvis)
Reverse transcription (Revers transkripsjon)	Vent	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Innledende denaturering)	Vent	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering og herding/forlengelse (datainnsamling))	2 - Temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

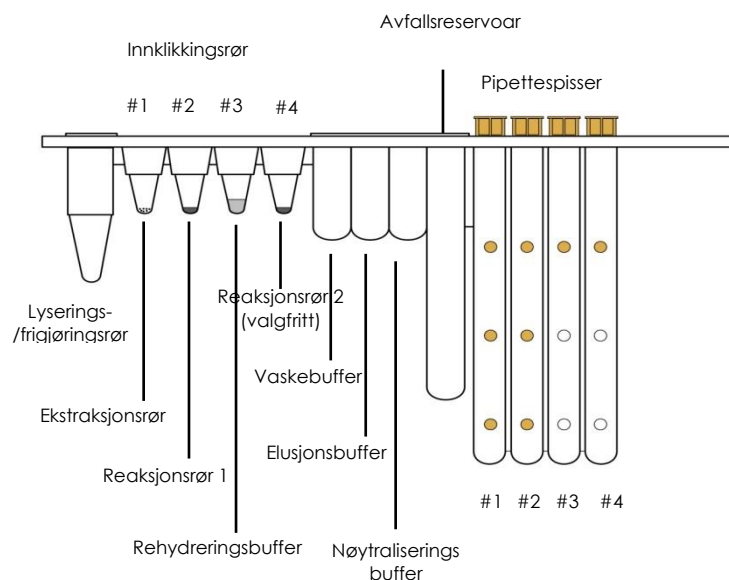
Tabell 5. PCR-protokoll.

- 12) Klikk på knappen "Save test" (Lagre test).

8.3.2. Sette opp BD MAX™-stativet

- 1) Ta ut en separat modulreagensstrimmel fra BD MAX™ ExK™ TNA-3-settet for hver prøve som skal testes. Dunk forsiktig hver strimmel mot en hard overflate for å sikre at alle væskene ligger i bunnen av rørene, og sett dem inn i BD MAX™ System prøvestativ.
- 2) Ta ut nødvendig antall BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (ekstraksjonsrør) (B4) (hvit folie) fra beskyttelsesposen. Klikk Extraction Tube(s) (ekstraksjonsrøret(ene)) (hvit folie) på plass i deres respektive posisjoner i TNA-strimmelen (posisjon 1, hvit fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
- 3) Fastslå og adskill egnet antall SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube (reaksjonsrør) (blå folie), og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (klikk posisjon 2, grønn fargekode på stativet. Se figur 1.)
 - a. Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
 - b. For riktig rehydrering må du passe på at det frysetørkede produktet er i bunnen av røret og ikke har festet seg til det øverste området av røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
 - i. Merk: Hvis du velger formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dobbel mastermix konsentrert lyofilisert MM med rehydreringsbuffer (type 5)) (avsnitt 8.3.1), må du fastslå og adskille egnet antall ekstra SARS-CoV-2 reaction tubes (1G-folie hvis det gjelder VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) og klikke dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 2, blå fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk aluminiumsposen med lynlåsen.
- 4) Ta ut nødvendig antall Rehydration Buffer tubes (rehydreringsbufferrør) (11-folie) og klikk dem på plass i deres respektive posisjoner i strimmelen (posisjon 3, uten fargekode på stativet. Se figur 1.) Fjern overflødig luft og lukk posen med lynlåsen.
 - a. For å sikre riktig overføring må du passe på at væsken er i bunnen av røret og ikke har festet seg øverst i røret eller til folietetningen. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at hele bufferen er i bunnen av røret.

Figur 1. BD MAX™ TNA reagensstrimmel (TNA) fra BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Sette opp BD MAX™-instrumentet

- 1) Velg fanen "Work List" (Arbeidsliste) på skjermen "Run" (Kjør) i BD MAX™ System programvare v4.50A eller nyere.
- 2) I nedtrekksmenyen "Test", velg VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) (hvis den ikke allerede er opprettet, se avsnitt 8.3.1).
- 3) Velg riktig lotnummer for settet (du finner det på ytteresken til ekstraksjonssettet som brukes) fra nedtrekksmenyen (valgfritt).
- 4) Oppgi ID-nummeret til prøvebufferrøret i vinduet "Sample Tube" (Prøverør) i "Work List" (Arbeidsliste), enten ved å skanne strekkoden eller ved å skrive det inn manuelt.
- 5) Fyll ut prøve-/pasient-ID og/eller vinduet "Accession" (Tilgang) i "Work List" (Arbeidsliste) og klikk på knappen "Save" (Lagre). Fortsett helt til du har lagt inn alle prøvebufferrørene. Sørg for at prøve-/pasient-ID og prøvebufferrørene samsvarer.
- 6) Plasser det klargjorte prøvebufferrøret i BD MAX™-stativet(ene).
- 7) Plasser stativet(ene) i BD MAX™ System (stativ A settes på venstre side av BD MAX™ System og stativ B settes på høyre side).
- 8) Plasser nødvendig antall BD MAX™ PCR Cartridge(s) i BD MAX™ System.
- 9) Lukk døren på BD MAX™ System.
- 10) Klikk på "Start Run" (Start kjøring) for å begynne prosedyren.

8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Gå til hovedmenyen og klikk på knappen "Results" (Resultater).
- 2) Enten dobbeltklikk på kjøringen din i listen eller trykk på knappen "View" (Vis).
- 3) Klikk på "Print" (Skriv ut), og velg: "Run Details, Test Details and Plot..." (Kjøringsdetaljer, testdetaljer og plott ...).
- 4) Klikk på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller eksporter) på skjermbildet "Run Reports" (Kjøringsrapporter).

9. Tolkning av resultater

For en detaljert beskrivelse av hvordan du analyserer dataene, se brukerhåndboken for BD MAX™ System.

Analyse med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System er ment å bli utført som en bekreftelse av prøver med positivt resultat for RNA fra SARS-CoV-2. Ved bruk sammen med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System på prøver med ukjent status for tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2, referer til gjeldende bruksanvisninger for tolkning av resultater for fastslåelse av RNA fra SARS-CoV-2.

Dataanalysen utføres av BD MAX™-programvaren i henhold til produsentens instruksjoner. BD MAX™-programvaren rapporterer Ct-verdier og amplifikasjonskurver for hver detektorkanal for hver prøve som testes, på følgende måte:

- En Ct-verdi på 0 indikerer at programvaren ikke beregnet noen Ct-verdi med den angitte terskelen (se tabell 3). En amplifikasjonskurve av prøven som viser en Ct-verdi på 0, må sjekkes manuelt.

En Ct-verdi på -1 indikerer at det ikke har funnet sted noen amplifikasjonsprosess.

Alle andre Ct-verdier må tolkes i sammenheng med amplifikasjonskurven og i henhold til retningslinjene for tolkning av prøver som er angitt i tabell 6.

Sjekk det interne kontrollsignalet for å kontrollere at amplifikasjonsblandingen fungerer som den skal. Sjekk også at det ikke finnes noen rapport om systemfeil i BD MAX™ System.

Bruk tabellen under til å lese av og analysere resultatene:

P681R mutasjonsmål (475/520)	L452R mutasjonsmål (530/565)	Endogen Intern kontroll (585/630)	Tolkning
+	-	+/- ¹	P681R mutasjon Påvist ¹
-	+	+/- ¹	L452R mutasjon Påvist ¹
+	+	+/- ¹	P681R-mutasjon og L452R-mutasjon påvist ¹
-	-	+ ¹	P681R-mutasjon og L452R-mutasjon ikke påvist ¹
-	-	- ²	UNR = Uavklart resultat oppnådd på grunn av hemmere i PCR-reaksjonen eller når det oppstår et generelt problem (ikke rapportert av en feilkode) med prøvebehandlings- og/eller amplifikasjonsstrinn.²
IND	IND	IND	IND = Ubestemmelig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med instrumentfeil knyttet til en feilkode.
INC	INC	INC	INC = Ufullstendig analyseresultat. Skyldes systemfeil i BD MAX™ System. Analyseresultatet vises i tilfeller med ikke fullført kjøring.

Tabell 6. Tolkning av prøve.

+: Amplifikasjon fant sted.

-: Ingen amplifikasjon fant sted.

1 En prøve anses som positiv hvis oppnådd Ct-verdi er under 40. Den endogene interne kontrollen (IC) kan i noen tilfeller gi et forsterket signal. IC deteksjonen er ikke alltid nødvendig fordi et høyt antall kopieringer av målet kan gi foretrukne forsterkninger av målspesifikke nukleinsyrer.

2 Hvis målstedene for P681R-mutasjon og L452R-mutasjon er negative, må IC vise et amplifikasjonssignal med Ct under 35. Fordi den endogene interne kontrollen er et housekeeping-gen som normalt skal finnes i alle humane nukleotide celler i den originale prøven, kan Ct-verdien variere veldig. Ved fravær av signal eller ved Ct-verdi ≥ 35 for den endogene interne kontrollen, anses resultatet som "Uavklart", og analysen må utføres på nytt.

Oppsummering av mutasjoner assosiert med følgende linjer til stede i de mest kjente bekymringsfulle variantene (Variants of Concern, VOC):

Linjer	WHO-merknad	Mutasjoner i S-genet ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

Tabell 7. Oppsummering av mutasjoner assosiert med kjente bekymringsfulle varianter (Variants of Concern, VOC).

¹Sporing av SARS-CoV-2-varianter: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (data opp til 02. september 2021).

²Oversikt over varianter/mutasjoner <https://covariants.org/variants> (data opp til 02. september 2021).

Andre varianter kan presentere mutasjoner P681R og L452R, da disse ikke er spesifikke for de nevnte variantene.

Den endelige tildelingen til en linje må gjøres ved sekvensialisering.

Ved vedvarende uklare resultat anbefales det å lese gjennom bruksanvisningen og gjennomgå ekstraksjonsprosessen som benyttes av brukeren; å bekrefte riktig bruk av hvert RT-qPCR-trinn og revidere parametrene; samt kontrollere sigdformen på kurven og fluoriseringens intensitet.

Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.

10. Testens begrensninger

- Testresultatene skal evalueres av helsepersonell i sammenheng med sykehistorikk, kliniske symptomer og andre diagnostiske tester.
- Selv om denne analysen kan brukes med andre typer prøver, har den blitt validert med nasofaryngeale/orofaryngeale prøvepensler og spyttprøver.
- Det lyofiliserte produktet må være i bunnen av røret og ikke klebet til toppområdet eller folietetningen for en vellykket utførelse. Dunk forsiktig hvert rør mot en hard overflate for å sikre at alt produktet ligger i bunnen av røret.
- Om reagensmiksturen har et stabilisert format – vanligvis lokalisert i bunnen av røret – og et utseende som er ulikt det vanlige utseendet (uten konisk form, ikke homogen, mindre/større i størrelse og/eller har en annen farge enn hvitaktig), endrer ikke dette prøvens funksjonalitet.
- Kvaliteten på testen avhenger av kvaliteten på prøven; nukleinsyre må ekstraheres på riktig måte fra luftveisprøver.
- Prøven er en kvalitativ test og gir ingen kvantitative verdier eller indikerer mengden av organismer i prøven.
- Ekstremt lave målenivåer som ligger under påvisningsgrensen vil muligens bli påvist, men resultatene vil ikke kunne reproduseres.
- Prøver med en Ct-verdi på mellom 35 og 40 kan vise større foranderlighet i resultatet som oppnås.
- Det finnes en mulighet for falske positive resultater grunnet krysskontaminering av RNA fra SARS-CoV-2 med P681R-mutasjon eller L452R-mutasjon i S-genet, enten fra prøver som inneholder høye konsentrasjoner av mål-RNA eller kontaminering grunnet PCR-produkter fra tidligere reaksjoner.

- De spesifikke kombinasjonene av primer og probe for påvisning av P681R-mutasjon eller L452R-mutasjon som benyttes i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, viser ikke betydelige kombinerte homologier med det humane genomet, human mikroflora eller andre coronavirus, som kunne resultere i forutsigbare falske positive resultater.
- Falske negative resultat kan komme av flere faktorer og kombinasjoner av disse faktorene, inkludert:
 - Feilaktig innsamling, transport, oppbevaring, og/eller håndtering av prøvematerialet.
 - Feilaktig prosedyrebehandling (inkludert RNA ekstraksjon).
 - Nedbrytning av viralt RNA gjennom transport/ oppbevaring og/eller behandling av prøvematerialet.
 - Mutasjon eller polymorfisme i primer eller probe bindingområder kan påvirke oppdagelsen av nye eller ukjente SARS-CoV-2 varianter.
 - Virusmengden i prøvematerialet er under grensen for påvisning i analysen.
 - Forekomst av RT-qPCR-hemmere eller andre typer forstyrrende substanser. Påvirkning fra vaksiner, antivirale legemidler, antibiotika, kjemoterapeutika og immunsuppressive legemidler brukt til å forhindre COVID-19 eller brukt til behandling av infeksjonen, har ikke blitt evaluert.
 - Instruksjonene for bruk og analyseprosedyren blir ikke fulgt.
- Noen prøver vil ikke vise amplifikasjonskurver for *Rnase P* på grunn av lav mengde humane celler i den opprinnelige kliniske prøven. Et negativt IC-signal utelukker ikke tilstedeværelse av P681R-mutasjon eller L452R-mutasjon i en klinisk prøve.
- En positiv test indikerer ikke nødvendigvis levedyktige virus og antyder ikke at virusene er infeksiøse eller er den bakenforliggende årsaken til kliniske symptomer. Men en positiv test indikerer tilstedeværelsen av målets virussekvenser.
- Tilstedeværelse av P681R- og L452R-mutasjoner er forbundet med variantene Kappa, avstamning B.1.617.1) og Delta (avstamning B.1.617.2); imidlertid må endelig tilskrivelse til en avstamning gjøres via sekvensering.
- Negative resultater utelukker ikke tilstedeværelse av RNA fra SARS-CoV-2 da denne analysen er ment for bruk med prøver som er positive for SARS-CoV-2.
- I tilfelle av uavklarte, ubestemte eller ufullstendige resultater ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, må testen gjentas. Uavklarte resultater kan skyldes tilstedeværelse av hemmere i prøven eller en ukorrekt rehydrering av røret med lyofilisert reaksjonsblanding. Hvis det oppstår instrumentsvikt, vil resultatene som oppnås være ubestemte eller ufullstendige.

11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inneholder en endogen intern kontroll (IC) i hvert reaksjonsrør som bekrefter at teknikken fungerer som den skal.

12. Ytelseegenskaper

12.1. Klinisk sensitivitet og spesifisitet

Den kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble testet ved bruk av kliniske prøver (nasofaryngeale prøvepensler) som allerede ble karakterisert som positive eller negative for SARS-CoV-2 for pasienter. Resultatene var som følger:

	Sted	Prøvetype	Arbeidsflyt	Mål
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spania)	nasofaryngeal prøvempensel	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	P681R-mutasjon
				L452R-mutasjon

Tabell 8. Sted, prøvetype, arbeidsflyt og mål.

Sanne positive og negative verdier, falske positive og negative verdier, samt verdier for sensitivitet og spesifisitet for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble regnet ut i forhold til hver komparatoranalyse som vist i tabellen nedenfor:

Sted	Komparatoranalyse	Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Spesifisitet
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit for molekylær analyse og sekvensering	P681R-mutasjon	99	98	0	1	99 % (93 – 99)	100 % (95–100)
		L452R-mutasjon	92	98	0	8	92 % (84 – 96)	100 % (95 – 100)

Tabell 9. Ekte positive (TP) og negative verdier (TN), falske positive (FP) og negative verdier (FN), sensitivitet, spesifisitetsverdier for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

For å kunne evaluere kompatibilitet av forskjellige prøvematriser (nasofaryngeal prøvempensel, orofaryngeal prøvempensel og nasofaryngeal/orofaryngeal prøvempensel i virustransportmedium (VTM) fra Vircell) ble det utført en kompatibilitetsstudie. Resultatene oppnådd viste at de tre forskjellige prøvematrissene var kompatible med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Den provisoriske kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med spyttprøver ble evaluert. Negative enkeltprøver av spytt med tilsetninger med en kjent konsentrasjon av syntetisk cDNA-fragment for P681R-mutasjon og L452R-mutasjon i S-genet tilhørende SARS-CoV-2 ble testet. Evalueringen var designet for å utføres med 20 positive prøver (10 prøver 2xLoD og 10 prøver 10xLoD) og 10 negative prøver. Denne analysen ble utført ved bruk av et 750 µl prøvolum for hver tilstand, tilsatt i Sample Buffer Tube (SBT) (prøvebufferrør) fra TNA-3 Extraction Kit, og den ble kjørt i full prosessmodus (automatisk ekstraksjon og PCR-amplifisering) ved bruk av BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Prosentvis overensstemmelse ble regnet ut i forhold til forventede resultater for hver enkelt prøve og resultatene er vist i følgende tabell.

Spyttprøve	Overensstemmelse
Positive prøver	95 %
Negative prøver	100 %

Tabell 10. Prosentvis overensstemmelse for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med spyttprøver.

I tillegg ble en komparativ analyse av nasofaryngeale prøvempensler og spyttprøver utført for å evaluere den kliniske ytelsen til VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med spyttprøver. 7 spyttprøver og deres tilsvarende nasofaryngeale prøvempensel ble analysert og sammenlignet med 100 % overenskomst. Begge mutasjoner (P681R og L452R) ble påvist i de seks spyttprøvene karakterisert som Delta-variant.

Mål	TP	TN	FP	FN	Sensitivitet	Spesifisitet
P681R-mutasjon	6	1	0	0	100 % (51 – 100)	Ikke gjeldende
L452R-mutasjon	6	1	0	0	100 % (51 – 100)	Ikke gjeldende

Tabell 11. Ekte positive (TP) og negative verdier (TN), falske positive (FP) og negative verdier (FN), sensitivitet, spesifisitsverdier for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Grunnet den begrensede tilgjengeligheten til negative prøver, var det ikke mulig å beregne klinisk spesifisitet for testen.

Konklusjonen er at spyttprøver er kompatible med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

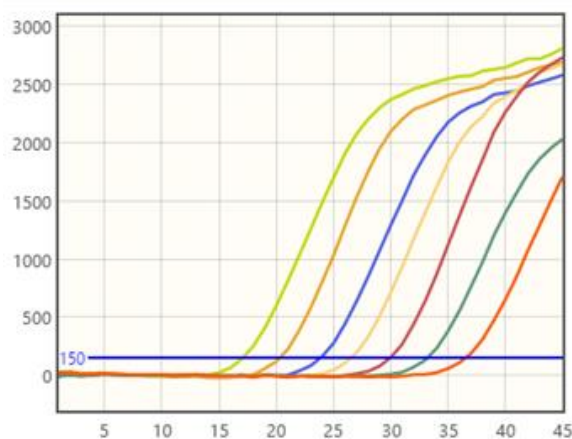
Resultatet viser høy overensstemmelse for påvisning av P681R- og L452R-mutasjoner ved bruk av VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Analytisk sensitivitet

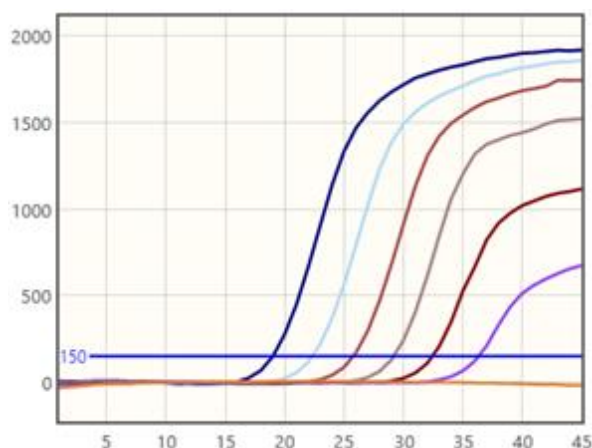
VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System påvisningsgrense (LoD) resultater med en positiv andel på ≥ 95 % er som følger:

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrad (LoD) på ≥ 40 genomkopier/reaksjon på nasofaryngeale prøver og ≥ 250 genomkopier/reaksjon på spyttprøver for P681R-mutasjon.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en påvisningsgrad (LoD) på ≥ 40 RNA-kopier/reaksjon på nasofaryngeale prøver og ≥ 500 RNA-kopier/reaksjon på spyttprøver for L452R-mutasjon.

Figur 2. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 Variant II (P681R-mutasjon) (syntetisk cDNA) ($5.3 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^1$ kopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).



Figur 3. Fortynningsserien av SARS-CoV-2 Variant II (L452R-mutasjon) (syntetisk cDNA) ($5.3 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^1$ kopier per reaksjon) med mal kjørt på BD MAX™ System (kanal 530/565 (HEX)).



12.3. Analytisk spesifisitet

Spesifisitet for analyse av SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) ble bekreftet ved testing av et panel bestående av forskjellige mikroorganismer som representerte de vanligste luftveispatoгенene. Ingen kryssreaktivitet ble påvist mellom noen av de følgende testede mikroorganismene:

Test av kryssreaktivitet					
Humant adenovirus, type 1–5, 8, 15, 31, 40 og 41	-	Influenzavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 og 4	-
Bocavirus	-	Influenzavirus A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 og g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influenzavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Humant rhinovirus	-
Bordetella holmesii	-	Influenzavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Respiratorisk syncytialt virus (RSV) A/B	-
Bordetella parapertussis	-	Influenzavirus A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)	-	Staphylococcus aureus	-
Bordetella pertussis	-	Influenzavirus A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Streptococcus pneumoniae	-
Chlamydia caviae	-	Influenzavirus B/Brisbane/60/2008	-	Streptococcus pyogenes	-
Chlamydia psittaci genotype A og C	-	Influenzavirus A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	SARS Coronavirus stamme Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenzavirus B/Phuket/3073/2013	-	Human 2019-nCoV-stammen BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 og HKU1	-	Influenzavirus B/Florida/04/06	-	Human 2019-nCoV-stammen 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
MERS Coronavirus	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (SARS-CoV-2 isolat Australia/VIC01/2020)*	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 og B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolat Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2-stammen 2019nCoV/USAWA1/2020*	-
Enterovirus 68, 71	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*	-

Test av kryssreaktivitet					
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella pneumophila	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*	-
Influenzavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Humant metapneumovirus A og B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenzavirus A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	Avstamningene SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 og SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 (Alpha-variant) *	-
Influenzavirus A/California/7/2009(H1N1) pdm09	-	Mycoplasma pneumoniae	-	SARS-CoV-2 B.1.351-avstamning (Beta-variant) *	-
Influenzavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-virus	-	Mycobacterium tuberculosis	-	SARS-CoV-2 P.1-avstamning (Gamma-variant) *	-

Tabell 13. Patogene mikroorganismer benyttet som referanse i denne studien.

* Merk at påvisning av disse SARS-CoV-2-stammene ikke er tatt med i betraktning i denne analysen. Denne testen er designet for den kvalitative påvisningen av P681R-mutasjon og L452R-mutasjon i S-genet, til stede i flere varianter av SARS-CoV-2.

12.4. Analytisk reaktivitet










Reaktiviteten til VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System ble evaluert mot syntetiske RNA-kontroller fra Kappa-variant (B.1.617.1 India/CT-ILSGS00361/2021) og kliniske prøver karakterisert som Delta-variant (B.1.617.2) ved sekvensering, som viste positive resultater.

Bibliography/ Litteratur

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/ Symboler for IVD-komponenter og reagenser

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device In vitro-diagnostisk enhet	 Keep dry Holdes tørr	 Use by Brukes innen	 Manufacturer Produsent	 LOT Batch code (Lot) Partikode (lot)
 i	Consult instructions for use Les bruksanvisningen	 Temperature limitation Temperaturgrenser	 Contains sufficient for <n> test Inneholder nok til <n> tester	DIL Sample diluent Prøvediluent	 REF Catalog number Katalognummer

Trademarks

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

Change Control / Endringskontroll		
Version No. / Versjon nr.	Changes / Endringer	Date / Dato
00	Original version / Original versjon.	26/10/2021

Table A 2. Control change table/ Tabell over endringskontroller.

Revision: 26 Oktober 2021

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01

