

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 / Estas instruções de utilização aplicam-se à seguinte referência:

PRODUCT / PRODUTO	REFERENCE / REFERÊNCIA
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. / Referência do produto a usar com o 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

Índice

1.	Utilização prevista	20
2.	Introdução e explicação	20
3.	Princípio do procedimento	21
4.	Reagentes fornecidos	21
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos.....	22
6.	Condições de transporte e armazenamento.....	22
7.	Precauções para o utilizador.....	22
8.	Procedimento do teste	24
8.1.	Colheita, armazenamento e transporte de amostras	24
8.2.	Preparação da amostra e extração de ARN	24
8.3.	Protocolo de PCR.....	25

9.	Interpretação dos resultados.....	29
10.	Limitações do teste.....	31
11.	Controlo de qualidade	32
12.	Características do teste	32
12.1.	Sensibilidade e especificidade clínica	32
12.2.	Sensibilidade analítica.....	34
12.3.	Especificidade analítica.....	35
12.4.	Reatividade analítica	36
	Bibliography/ Bibliografia	37
	Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos para componentes IVD e reagentes	38
	Trademarks.....	38

ENGLISH

1. Intended use

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

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

This test is intended to be used as an aid to monitor the prevalence of P681R or L452R mutations in the S gene and to assist in control measures. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time RT-PCR, employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA is extracted from specimens, and complementary DNA (cDNA) is synthesized and amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for P681R and L452R mutations.

2. Summary and Explanation

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

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

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

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

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

That is why, the appearance of variants that increase the transmissibility of the virus, its virulence or that escape the action of the neutralizing antibodies generated after natural infection or the vaccine, constitute a first-order public health problem that can have an important impact on control of the pandemic.

For this reason, VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been designed to allow the detection of the main mutation associated with the variant under surveillance.

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is designed for the qualitative detection of RNA with P681R and L452R mutations in the *S* gene of SARS-CoV-2 from positive nasopharyngeal and oropharyngeal swabs and saliva samples. The detection is done in one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction tube. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase, which is followed by the amplification of a conserved region of *S* gene of SARS-CoV-2 for P681R mutation and L452R mutation using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains in each tube all the components necessary for real-time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase, reverse-transcriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an Endogenous Internal Control (IC) (human *RNase P* gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
P681R mutation	475/520	<i>S</i> gene
L452R mutation	530/565	<i>S</i> gene
Endogenous Internal Control (IC)	585/630	human <i>RNase P</i> gene

Table 1. Target, channel and genes.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System includes the following materials and reagents detailed in Table 2:

Reagent/Material	Description	Color or Barcode	Amount
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	A mix of enzymes, primers-probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous internal control in stabilized format	Blue foil	2 pouches of 12 transparent tubes
Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	11 foil	1 pouch of 24 transparent tubes

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System with Cat. N°. VS-VAD124 (444218).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

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

6. Transport and storage conditions

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

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health care professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing and the BD MAX™ System are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive

displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges (BD MAX™ PCR Cartridge).

- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- If the kit is used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), please refer to the corresponding instructions for use.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Sample collection, storage and transport

The VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System has been tested on nasopharyngeal swabs and saliva samples, both collected in viral transport medium (VTM) – Vircell S.L. -; BD™ Universal Viral Transport (UVT) System media – BD - or IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) -Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd and oropharyngeal swabs collected in viral transport medium (VTM) - Vircell. Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory and saliva samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), we recommend

shipping at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

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

8.2. Sample preparation and RNA extraction

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

When using nasopharyngeal or oropharyngeal specimens:

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

In case of using saliva samples collected in transport media:

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

In case of using neat saliva samples:

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

8.3. PCR protocol

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

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

Note: If you have already created the test for the VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the Basic Information tab, within the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R).
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 950 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) If running software version 5.00 or higher, in the "Custom Barcodes" select the following configuration:
 - a. Snap-In 2 Barcode: leave empty (concerning SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube no barcode configuration is needed).
 - b. Snap-In 3 Barcode: 11 (concerning Rehydration Buffer tube).
 - c. Snap-In 4 Barcode: 1G if used in combination with SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube and the format "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1).
- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 3).
 - a. Note: Product may be used in combination with the VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215), "PCR Settings" and "Test Steps" should be completed for Snap-In 4 (blue) position (see the corresponding instructions for use).

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

Table 3. PCR settings.

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

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

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

Table 4. Spectral cross-talk parameters.

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

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

Table 5. PCR protocol.

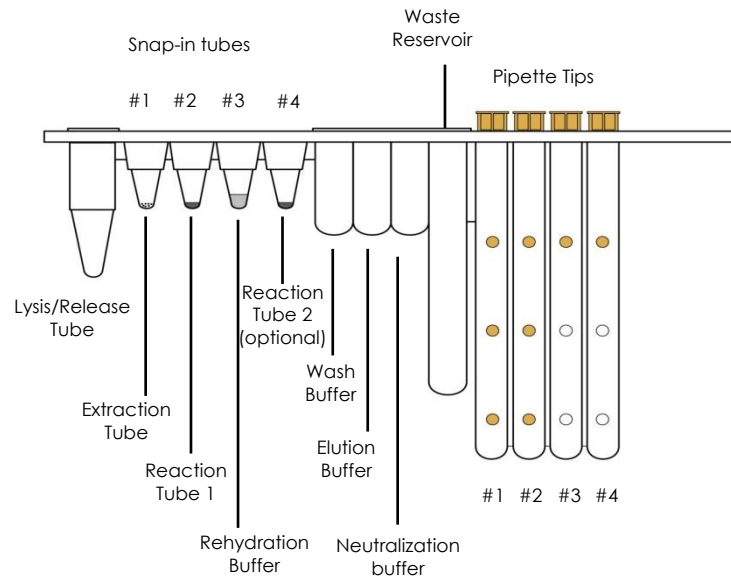
- 12) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tubes (blue foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminium pouches with the zip seal.
 - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
 - Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional SARS-CoV-2 reaction tubes (1G foil in case of VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2) test) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminium pouches with the zip seal.

- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (11 foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the buffer is at the bottom of the tube.

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



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

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

8.3.4. BD MAX™ report

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

9. Result interpretation

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

Analysis of the VIASURE SARS-CoV-2 *Variant II (P681R+L452R)* Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System is intended to be performed as a reflex on samples with positive result for SARS-CoV-2 RNA. If used in conjunction with VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System on samples of unknown status for presence of SARS-CoV-2 RNA, please refer to those instructions for use for results interpretation for determination of the SARS-CoV-2 RNA result.

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

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

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

Results should be read and analysed using the following table:

P681R mutation target (475/520)	L452R mutation target (530/565)	Endogenous Internal Control (585/630)	Interpretation
+	-	+/- ¹	P681R mutation Detected ¹
-	+	+/- ¹	L452R mutation Detected ¹
+	+	+/- ¹	P681R mutation and L452R mutation Detected ¹
-	-	+ ¹	P681R mutation and L452R mutation Not Detected ¹
-	-	- ²	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.²
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 6. Sample interpretation.

+: Amplification occurred.

-: No amplification occurred.

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

2 In the case of P681R mutation and L452R mutation targets sites negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human housekeeping gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Endogenous Internal Control, the result is considered as 'Unresolved', and retesting is required.

Summary of mutations associated with the following lineages present in the most known Variants of Concern (VOC):

Lineages	WHO label	Mutations in the S gene ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

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

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

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

Other variants can present the mutations P681R and L452R because they are not specific for the variants mentioned.

Final assignment to a lineage must be done by sequencing.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swabs and saliva samples.
- For good test performance, the lyophilized product should be at the bottom of the tube and not adhered to the top area of the tube or the foil seal. Gently tap each tube on a hard surface to make sure all the product is at the bottom of the tube.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- Samples with a Ct value between 35 and 40 might show greater variability in the results obtained.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2 RNA with P681R mutation or L452R mutation in the S gene, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for detection of P681R mutation or L452R mutation used in VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other coronaviruses, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2 variant.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.

- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence of P681R mutation or L452R mutation in a clinical specimen.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences.
- The presence of the P681R and L452R mutations is associated with Kappa (lineage B.1.617.1) and Delta (lineage B.1.617.2) variants, however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.
- Negative results do not preclude presence of SARS-CoV-2 RNA due to this assay is intended to be used with positive SARS-CoV-2 samples.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contains an Endogenous Internal Control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System was tested using clinical samples (nasopharyngeal swabs) already characterized as positive or negative for SARS-CoV-2, from patients. The results were as follows:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spain)	nasopharyngeal swab	BD MAX™ EXK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	P681R mutation L452R mutation

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

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, and specificity for VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit molecular assay + sequencing	P681R mutation	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100% (95 – 100)
		L452R mutation	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

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

In order to evaluate the compatibility of different sample matrices (nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab and nasopharyngeal/oropharyngeal swab in Viral Transport Medium (VTM) from Vircell), a compatibility study have been carried out. The obtained results showed that the three different sample matrices were compatible with the VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

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

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

Saliva sample	Agreement
Positive samples	95%
Negative samples	100%

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

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

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

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

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

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

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

12.2. Analytical sensitivity

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

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

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

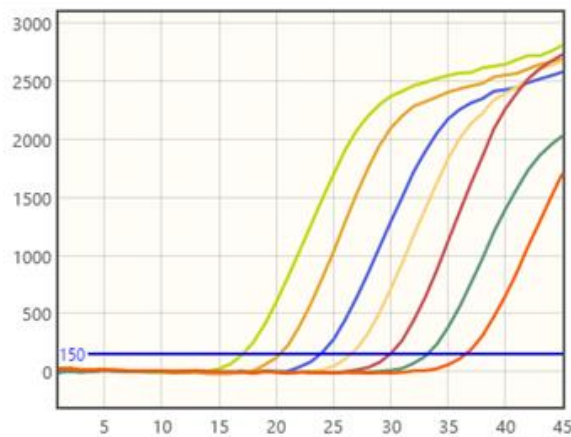
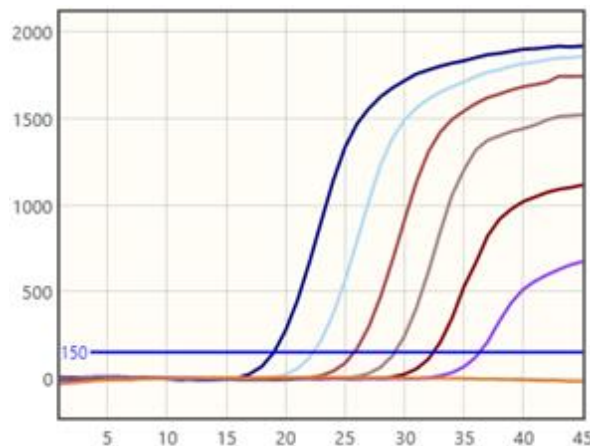


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) (5.3×10^6 - 5×10^1 copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Bocavirus	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	Pneumocystis jirovecii Type A1 and g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	Human rhinovirus	-
Bordetella holmesii	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A/B	-
Bordetella parapertussis	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Staphylococcus aureus	-
Bordetella pertussis	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Streptococcus pneumoniae	-
Chlamydia caviae	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Streptococcus pyogenes	-
Chlamydia psittaci genotype A and C	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/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.

PORTUGUÊS

1. Utilização prevista

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System é um teste automatizado de RT-PCR em tempo real, concebido para a deteção qualitativa de mutação P681R e mutação L452R no gene S de ARN em esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos e amostras de saliva positivos para o SARS-CoV-2.

O ensaio destina-se a ser utilizado com amostras positivas para SARS-CoV-2 ou, quando o teste é realizado em conjunto com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref: 444215) com amostras de doentes com suspeita de doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) pelo seu profissional saúde (PS).

O teste destina-se a ser utilizado como auxiliar na monitorização da prevalência de mutações P681R ou L452R no gene S e para auxiliar nas medidas de controlo. O ensaio utiliza o BD MAX™ System para levar a cabo a extração automática de ARN e subsequente RT-PCR em tempo real utilizando os reagentes fornecidos juntamente com reagentes universais e descartáveis para o BD MAX™ System. O ARN é extraído das amostras e o ADN complementar (ADNc) é sintetizado e amplificado utilizando RT-PCR e detetado utilizando sondas marcadas com uma molécula fluorescente específicas para mutações P681R e L452R.

2. Introdução e explicação

Todos os vírus, incluindo o SARS-CoV-2, sofrem mutações com o tempo. Algumas alterações podem afetar as propriedades do vírus, tais como a facilidade de propagação, a gravidade da doença associada, ou o desempenho de vacinas, medicamentos terapêuticos, ferramentas de diagnóstico, ou outras medidas sociais e de saúde pública.

O aparecimento de mutações genéticas é um acontecimento natural e esperado dentro do processo evolutivo de um vírus. De facto, algumas mutações específicas definem os grupos genéticos virais que estão atualmente em circulação a nível mundial. Além disso, graças à sequenciação genética do agente patogénico a nível mundial, foi possível estabelecer padrões de dispersão e evolução do vírus.

No final de 2020, o aparecimento de variantes com maior risco para a saúde pública levou à caracterização de Variantes de Interesse (VOI) e Variantes de Preocupação (VOC), a fim de facilitar o controlo epidemiológico. Algumas destas variantes do SARS-CoV-2 são:

As variantes Delta (linhagem B.1.617.2) e Kappa (linhagem B.1.617.1) foram estreitamente associadas a um enorme aumento da COVID-19 na Índia durante a primavera de 2021. A variante Delta tem múltiplas mutações na proteína da espícula, incluindo P681R e L452R. A variante Kappa também tem mutações genéticas na proteína da espícula, incluindo P681R, L452R e E484Q.

Todas estas mutações descritas acima mostram potencial redução na neutralização por algumas imunoterapias e redução dos efeitos esperados das vacinas ou foram identificadas como causadoras da transmissão comunitária.

É por isso que o aparecimento de variantes que aumentam a transmissibilidade do vírus, a sua virulência ou que escapam à ação de anticorpos neutralizadores gerados após infecção natural ou após a vacina, constitui um problema de saúde pública de primeira ordem, que pode ter um impacto importante no controlo da pandemia.

Por esta razão, o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para permitir a deteção da mutação principal associada à variante sob vigilância.

3. Princípio do procedimento

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi concebido para a deteção qualitativa de ARN com mutação P681R e L452R no gene S do SARS-CoV-2 em esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos e amostras de saliva positivos. A deteção realiza-se através de um formato RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa e subsequente amplificação da sequência-alvo específica ocorrem no mesmo tubo de reação. O ARN-alvo isolado é transcrito gerando ADN complementar por transcriptase reversa, seguindo-se a amplificação de uma região conservada do gene S do SARS-CoV-2 para a mutação P681R e a mutação L452R utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com fluorescência.

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseia-se na atividade da exonuclease 5' da polimerase do ADN. Durante a amplificação do ADN, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de ADN complementar, separando o fluoróforo do quencher. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente proporcional à quantidade do modelo alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para realizar o ensaio PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase, transcriptase reversa) num formato estabilizado, bem como um controlo interno endógeno para monitorizar o processo de extração e/ou a inibição da atividade da polimerase. O ensaio utiliza um gene de manutenção (housekeeping) humano como controlo interno (CI) endógeno (gene RNase P humano). Os genes de manutenção humanos estão envolvidos na manutenção celular básica e, por conseguinte, espera-se que estejam presentes em todas as células humanas nucleadas e mantenham níveis de expressão relativamente constantes.

Alvo	Canal	Gene
Mutação P681R	475/520	Gene S
Mutação L452R	530/565	Gene S
Controlo interno (CI) endógeno	585/630	Gene RNase P humano

Tabela 1. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Cor ou Código de barras	Quantidade
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	Uma mistura de enzimas, sondas oligonucleotídicas, tampão, dNTPs, estabilizadores e controlo interno endógeno em formato estabilizado	Selo azul	2 envelopes de 12 tubos transparentes
Rehydration Buffer tube	Solução para a reconstituição do produto estabilizado	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com o N.º Ref.º VS-VAD124 (444218).

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais e equipamento necessários para a utilização mas que não estão incluídos no VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtice.
- Micropipetas (entre 2 e1000 µL).
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.
- Opcional: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.º: 444215)

6. Condições de transporte e armazenamento

- O transporte e armazenamento do kit pode ser realizado de 2 a 40 °C até à data de validade indicada na etiqueta.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado até 28 dias.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado apenas por utilizadores profissionais, como profissionais de saúde e técnicos de laboratório, com formação em técnicas de biologia molecular.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou as bolsas que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.

- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os tubos de reação com o fecho zip imediatamente depois de cada utilização. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Proteger os componentes da luz.
- Em casos em que outros testes de PCR estejam a ser realizados na mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de garantir que o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, o BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraction Kit, eventuais reagentes adicionais necessários para o ensaio e o BD MAX™ System não são contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Usar vestuário de proteção, luvas não reutilizáveis, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) N.º 1907/2006 (REACH), os VIASURE Real Time PCR Detection Kits não requerem Fichas de Dados de Segurança do Material (Safety Data Sheets) tendo em conta a sua classificação como não perigosos para a saúde e para o ambiente, pois não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de risco disponíveis no Regulamento (CE) N.º 1272/2008 (CLP) ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a respetiva declaração.

- Em conclusão, as amostras de saliva revelaram-se compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System. 444215); consulte as instruções de utilização correspondentes.
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, armazenamento e transporte de amostras

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado em esfregaços nasofaríngeos e amostras de saliva colhidos em meio de transporte viral (MTV) – Vircell S.L. -; meios BD™ Universal Viral Transport (UVT) System – BD - ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) - Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, e esfregações orofaríngeos colhidos em meio de transporte viral (MTV) - Vircell. Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

Para a colheita, armazenamento e transporte de espécimes devem ser seguidas as condições validadas pelo utilizador. Em geral, as amostras respiratórias e de saliva devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra), e processadas com a maior brevidade possível para garantir a qualidade do teste. As amostras devem ser transportadas entre 2 °C e 8 °C durante um período máximo de 72 horas, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração (mais de 72 horas), é recomendado o envio a uma temperatura ≤ -20 °C ou inferior. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o teste. As amostras podem ser armazenadas entre 2 °C e 8 °C por um período máximo de 72 horas ou podem ser congeladas a -20 °C ou, idealmente, a -70°C, para conservação. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

Os esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e as amostras de saliva têm de ser colhidos, transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais apropriadas. Para mais informações, consultar as orientações do CDC (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> e 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>) e as orientações da 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. Preparação da amostra e extração de ARN

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Ter em conta que outras amostras podem requerer pré-processamento. A utilização de outros procedimentos de preparação e extração específicos deve ser validada pelo utilizador.

Quando utilizar amostras nasofaríngeas e/ou orofaríngeas:

1. Pipetar entre 400 e 750 µl de esfregaço nasofaríngeo ou orofaríngeo colhido em meio de transporte viral (MTV), em meio BD™ Universal Viral Transport (UVT) System ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) para um tubo de tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

No caso de amostras de saliva colhidas em meio de transporte:

1. As amostras de saliva podem ser colhidas em meio de transporte viral (MTV), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) numa proporção de 1:3 (saliva:meio). Centrifugar a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Pipetar 750 µL da suspensão para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

No caso de utilizar amostras de saliva puras:

1. Combinar a saliva com o meio de transporte viral (MTV), BD™ Universal Viral Transport (UVT) ou IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) para que a proporção final de saliva:meio seja 1:3. Centrifugar a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Em seguida, pipetar 750 µL da suspensão para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o funcionamento do BD MAX™ System Operation.

8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do teste PCR para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System

Nota: Se já tiver sido criado o teste para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).
- 3) No separador de informações básicas, na janela "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: ou seja, VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R).
- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolha "Type 5" (Tipo 5).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.ª: 444215), em seguida selecionar "Dual Master Mix

Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)).

- 6) Em "Sample extraction parameters" (Parâmetros de extração de amostra) selecionar "User defined" (Definidos por utilizador) e ajustar o volume para 950 µL.
- 7) Em "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior, em "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): deixar vazio (relativamente ao tubo de reação de SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube não é necessária nenhuma configuração de código de barras).
 - b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).
 - c. "Snap-In 4 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 4): 1G se utilizado em combinação com o tubo de reação SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube e o formato "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with rehydration Buffer (Type 5)" (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1).
- 9) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir os seguintes parâmetros: "Channel Settings" (Definições de canais), "Gains" (Ganhos) e "Threshold" (Limite) (Tabela 3).
 - a. Nota: O produto pode ser utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (Ref.º: 444215); neste caso, completar "PCR Settings" (Definições de PCR) e "Test Steps" (Passos de teste) para a posição de encaixe 4 (azul) (consultar as instruções de utilização correspondentes).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganho)	Threshold (Limiar)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
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

Tabela 3. "PCR settings" (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No separador "PCR settings" (Definições de PCR) introduzir também os parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral) (Tabela 4).

		False Receiving Channel (Canal receptor falso)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	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	-	

Tabela 4. Parâmetros "Spectral Cross Talk" (Interação espectral).

11) No separador "Test Steps" (Passos de teste), introduzir o protocolo de PCR (Tabela 5).

Step Name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo(s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Deteção)
Reverse transcription (Transcrição reversa)	Retenção	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	Retenção	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/extensão (recolha de dados))	2-Temperatura	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

Tabela 5. Protocolo de PCR.

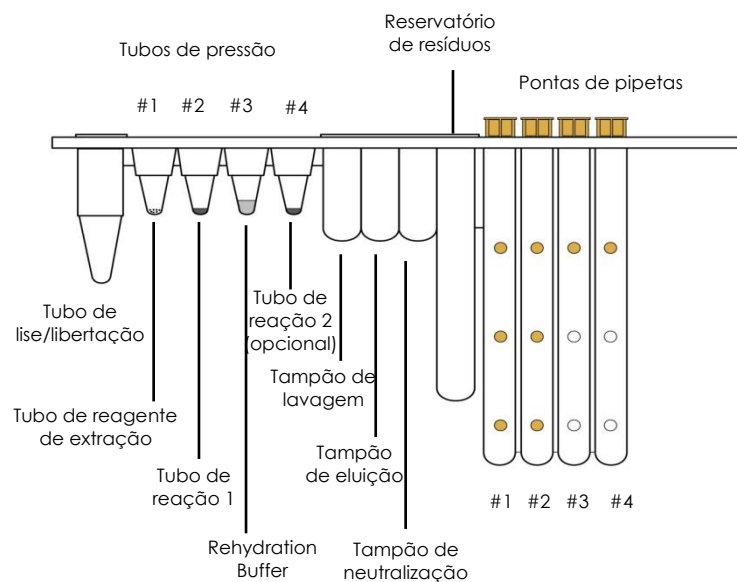
12) Clicar no botão "Save Test" (Guardar teste).

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- Determinar e separar o número adequado de tubos de reação SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube (selo azul) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 2, código de cor verde no suporte para tubos. Ver Figura 1).
 - Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.

- i. Nota: Se escolher o formato “Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Concentrado de mistura principal dupla liofilizado MM com tampão de reidratação (Tipo 5)) (Secção 8.3.1), calcular e separar o número adequado de tubos de reação dos testes SARS-CoV-2 adicionais (selo 1G no caso do teste VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2)) e colocá-los na sua posição correspondente dentro da tira (Posição de encaixe 4, código de cor azul no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tube (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - a. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou à película de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tiras de reagente individuais BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador “Work List” (Lista de trabalho) no ecrã “Run” (Executar) utilizando o software v4.50A ou um superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu de lista pendente “Test” (Teste), selecionar VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) Selecionar no menu de lista pendente o número de lote do kit de extração utilizado (que se encontra na caixa exterior). Este passo é opcional.
- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube na janela “Sample tube” (Tubo de amostra) no separador “Work List” (Lista de trabalho), através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de introdução manual.

- 5) Preencher a janela "Specimen/Patient ID" (ID de amostra/doente) e "Accession" (Acesso) do separador "Work list" (Lista de trabalho) e clicar no botão "Save" (Guardar). Continuar até estarem introduzidos todos os tubos de tampão de amostra (Sample Buffer Tubes). Certificar-se de que a identificação da amostra/doente e os Sample Buffer Tube estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o tampão de amostra (Sample Buffer Tube) preparado no(s) BD MAX™ Rack(s) (suportes para tubos do BD MAX™ System).
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start Run" (Iniciar execução) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório BD MAX™

- 1) No menu principal, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Fazer duplo clique no teste incluído na lista de ensaios ou selecionar o teste e premir o botão "view" (Visualizar).
- 3) Clicar no botão "Print" (Imprimir), selecionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalhes da execução, detalhes do teste e gráfico...).
- 4) Clicar no botão "Print" (Imprimir) ou "Export" (Exportar) no ecrã "Run Reports" (Relatórios da execução).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System destina-se a ser realizada como um reflexo em amostras com resultado positivo para ARN do SARS-CoV-2. Se utilizado em combinação com o VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System em amostras com estado desconhecido para a presença de ARN do SARS-CoV-2, consultar interpretação de resultados nas instruções de utilização para a determinação correta de ARN do SARS-CoV-2.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 3). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct de -1 indica que não houve processo de amplificação.
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 6.

Verificar a emissão do sinal do controlo interno para confirmar o correto funcionamento da mistura de amplificação. Para além disso, verificar que não há nenhuma anomalia do BD MAX™ System.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

Alvo da mutação P681R (475/520)	Alvo da mutação L452R (530/565)	Controlo interno endógeno (585/630)	Interpretação
+	-	+/- ¹	Mutação P681R detetada ¹
-	+	+/- ¹	Mutação L452R detetada ¹
+	+	+/- ¹	Mutação P681R e mutação L452R detetada ¹
-	-	+ ¹	Mutação P681R e mutação L452R não detetada ¹
-	-	- ²	Resultado não resolvido (UNR) Resultado obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ²
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro.
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.

Tabela 6. Interpretação da amostra.

+: Houve amplificação.

+: Não houve amplificação.

1 Uma amostra é considerada positiva se o valor Ct obtido for inferior a 40. O controlo interno (CI) endógeno poderá mostrar ou não um sinal de amplificação. Por vezes, a deteção do CI não é necessária porque um elevado número de cópias do alvo pode causar uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo.

2 No caso de locais-alvo negativos para mutação P681R e mutação L452R, o CI deve mostrar um sinal de amplificação com Ct inferior a 35. O valor Ct pode ser muito variável devido ao controlo interno endógeno ser um gene de manutenção humano que deve estar presente em todas as células humanas nucleadas na amostra original. Se houver ausência de sinal ou o valor CT for ≥ 35 do controlo interno endógeno, o resultado é considerado "não resolvido" e é necessário repetir o teste.

Resumo de mutações associadas com as seguintes linhagens presentes nas Variantes de Preocupação (VOC) mais conhecidas:

Linhagens	Identificação OMS	Mutações no gene S ¹	
		P681R	L452R
B.1.617.1	Kappa	X	X
B.1.617.2	Delta	X	X

Tabela 7. Resumo de mutações associadas a Variantes de Preocupação (VOC) conhecidas.

¹Rastreamento de variantes SARS-CoV-2: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (dados até 2 de setembro de 2021).

²Visão geral de variantes/mutações <https://covariants.org/variants> (dados até 2 de setembro de 2021).

Outras variantes podem apresentar as mutações P681R e L452R porque não são específicas das variantes mencionadas.

A atribuição final a uma linhagem tem de ser feita mediante sequenciação.

No caso de um resultado ambíguo contínuo, recomenda-se rever as instruções de utilização e o processo de extração empregue pelo utilizador, verificar o desempenho de todas as etapas do RT-qPCR e rever os parâmetros, e verificar o formato sigmoide da curva e a intensidade da fluorescência.

O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.

10. Limitações do teste

- O resultado do teste deve ser avaliado no contexto da história clínica, dos sintomas clínicos e outros testes de diagnóstico por um profissional de saúde.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado com esfregaços nasofaríngeos/orofaríngeos e amostras de saliva colhidos em MTV.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao selo de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; tem de ser extraído ácido nucleico de forma adequada a partir de amostras respiratórias.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos nem indica o número de organismos presentes.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Amostras com um valor Ct entre 35 e 40 podem mostrar uma maior variabilidade nos resultados obtidos.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada com ARN do SARS-CoV-2 com a mutação P681R ou a mutação L452R no gene S, quer por amostras que contêm elevadas concentrações de ARN alvo quer pela contaminação devida a produtos de PCR de reações anteriores.
- As combinações de oligonucleótidos e sondas específicas para deteção de mutação P681R ou mutação L452R utilizadas no VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, não apresentam homologies combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana, ou outros coronavírus, o que pode resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de ARN).
 - Degradação do ARN viral durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas podem afetar a deteção de variantes novas ou desconhecidas do SARS-CoV-2.

- Uma carga viral no espécime abaixo do limite de detecção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de RT-qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores utilizados para prevenir a COVID-19 ou utilizados durante o tratamento da infecção.
 - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- Algumas amostras podem não conseguir exibir curvas de amplificação de *RNase P* devido a um número baixo de células humanas na amostra clínica original. Um sinal de IC negativo não exclui a presença de mutação P681R ou mutação L452R num espécime clínico.
 - Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de vírus viáveis e não significa que estes vírus são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. Contudo, um resultado positivo é indicador da presença de sequências virais alvos.
 - A presença das mutações P681R e L452R está associada às variantes Kappa (linhagem B.1.617.1) e Delta (linhagem B.1.617.2), contudo a atribuição final a uma linhagem deve ser feita por sequenciação.
 - Os resultados negativos não excluem a presença de ARN do SARS-CoV-2 devido ao facto de este ensaio ter sido concebido para utilização em amostras positivas para o SARS-CoV-2.
 - Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos, com o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, será necessário repetir o teste. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System contém um controlo interno (CI) endógeno em cada tubo de reação que confirma o correto desempenho da técnica.

12. Características do teste

12.1. Sensibilidade e especificidade clínica

O desempenho clínico do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras clínicas (esfregaços nasofaríngeos) já caracterizadas como positivas ou negativas para SARS-CoV-2, de doentes. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Espanha)	esfregaço nasofaríngeo	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	Mutação P681R
				Mutação L452R

Tabela 8. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores positivos e negativos verdadeiros, valores positivos e negativos falsos, valores de sensibilidade e especificidade para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparador conforme indicado nas tabelas seguintes:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
1	Ensaio molecular + sequenciação com TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit	Mutação P681R	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100% (95 – 100)
		Mutação L452R	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

Tabela 9. Valores positivos (TP) e negativos verdadeiros (TN), valores positivos (FP) e negativos falsos (FN), valores de sensibilidade, especificidade, para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

De modo a avaliar a compatibilidade de diferentes matrizes de amostra (esfregaço nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo e esfregaço nasofaríngeo/orofaríngeo em meio de transporte viral (MTV) da Vircell), foi realizado um estudo de compatibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que as três diferentes matrizes de amostra eram compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Foi avaliado o desempenho clínico preliminar do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com amostras de saliva. Foram testadas amostras simples de saliva negativas marcadas com uma concentração conhecida de fragmento sintético de cDNA para a mutação P681R e mutação L452R no gene S pertencente ao SARS-CoV-2. A avaliação foi concebida para ser realizada com 20 amostras positivas (10 amostras 2xLoD e 10 amostras 10xLoD) e 10 amostras negativas. Este ensaio foi realizado utilizando um volume de amostra de 750 µL de cada condição, adicionado ao Sample Buffer Tube (SBT) do TNA-3 Extraction Kit e analisado no modo de processamento completo (Extração automática e amplificação PCR) utilizando o BD MAX™ ExK™ TNA-3.

A percentagem de concordância foi calculada em relação ao resultado esperado para cada amostra individual, sendo os resultados apresentados na tabela seguinte.

Amostra de saliva	Concordância
Amostras positivas	95%
Amostras negativas	100%

Tabela 10. Percentagem de concordância do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com amostras de saliva.

Além disso, foi realizada uma análise comparativa de esfregaços nasofaríngeos e amostras de saliva para avaliar o desempenho clínico do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System com amostras de saliva. Foram analisadas e comparadas 7 amostras de saliva e sua correspondente amostra nasofaríngea, observando-se 100% de concordância. Ambas as mutações (P681R e L452R) foram detetadas nas seis amostras de saliva caracterizadas como variante Delta.

Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade
Mutação P681R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*
Mutação L452R	6	1	0	0	100% (51 – 100)	n.a*

Tabela 11. Valores positivos (TP) e negativos verdadeiros (TN), valores positivos (FP) e negativos falsos (FN), valores de sensibilidade, especificidade, para o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

*Devido à disponibilidade limitada de amostras negativas, não foi possível realizar o cálculo da especificidade clínica do teste.

Em conclusão, as amostras de saliva revelaram-se compatíveis com o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

O resultado mostra concordância para detetar as mutações P681R e L452R utilizando o VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

12.2. Sensibilidade analítica

Os resultados obtidos a calcular o limite de deteção (LD) de VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, com uma taxa positiva de $\geq 95\%$, são os seguintes:

- O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção (LD) ≥ 40 cópias de ARN/reacção em amostras nasofaríngeas e ≥ 250 cópias de ARN/reacção em amostras de saliva para a mutação P681R.
- O VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System tem um limite de deteção (LD) ≥ 40 cópias de ARN/reacção em amostras nasofaríngeas e ≥ 500 cópias de ARN/reacção em amostras de saliva para a mutação P681R.

Figura 2. Diluições em série de um modelo de variante II do SARS-CoV-2 (mutação P681R) (ADNc sintético) ($5,3 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^1$ cópias de por reacção) no BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

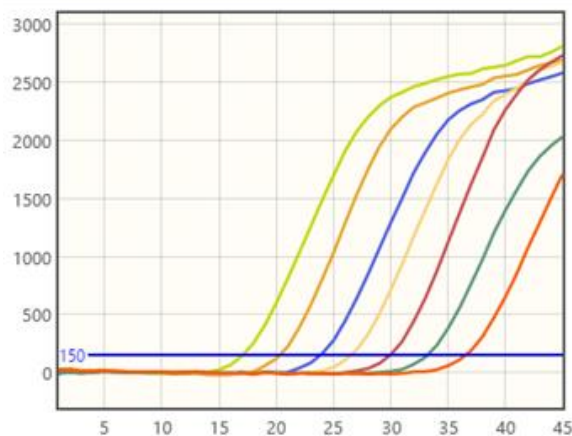
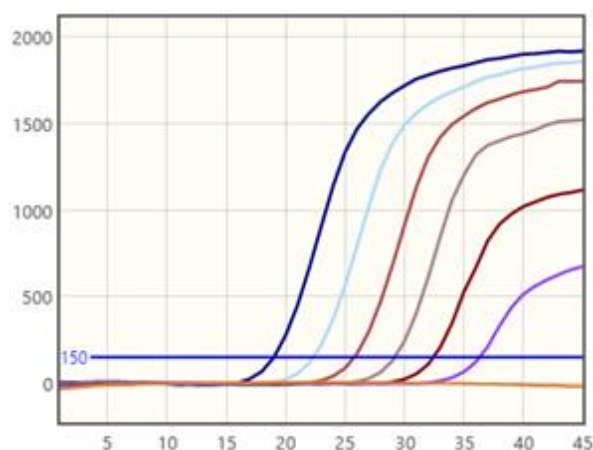


Figura 3. Diluições em série de um modelo de variante II do SARS-CoV-2 (mutação L452R) (ADNc sintético) ($5,3 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^1$ cópias por reacção) no BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).



12.3. Especificidade analítica

A especificidade do ensaio do SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) foi confirmada testando um painel composto por diferentes microrganismos que representam os agentes patogênicos respiratórios mais comuns. Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre qualquer um dos seguintes microrganismos testados:

Teste de reatividade cruzada					
Adenovírus humanos tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 e 41	-	Vírus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Vírus parainfluenza humano 1, 2, 3 e 4	-
Bocavirus	-	Vírus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii Type A1 e g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Vírus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Rinovírus humano	-
Bordetella holmesii	-	Vírus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Vírus sincicial respiratório (RSV) A/B	-
Bordetella parapertussis	-	Vírus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	-	Staphylococcus aureus	-
Bordetella pertussis	-	Vírus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Streptococcus pneumoniae	-
Chlamydia caviae	-	Vírus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Streptococcus pyogenes	-
Chlamydia psittaci genótipo A e C	-	Vírus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	Estirpe Frankfurt 1 do coronavírus SARS	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Vírus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	2019-nCoV humano, estirpe etaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Coronavírus humanos 229E, OC43, NL63 e HKU1	-	Vírus Influenza B/Florida/04/06	-	2019-nCoV humano, estirpe 2019-nCoV/Italy-INM11*	-
Coronavírus MERS	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (isolado de SARS-CoV-2 Austrália/VIC01/2020)	-
Enterovírus Cocksackievirus A24, A9 e B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (isolado de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovírus Echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2, estirpe 2019nCoV/USAWA1/2020*	-
Enterovírus 68, 71	-	Legionella micdadei	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*	-
Haemophilus influenzae MinnA	-	Legionella pneumophila	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*	-
Vírus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Metapneumovírus A e B humano	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Vírus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	Linhagens SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 e SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 (Variante Alpha)*	-
Vírus Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09	-	Mycoplasma pneumoniae	-	Linhagem SARS-CoV-2 B.1.351 (Variante Beta)*	-
Vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-	Linhagem SARS-CoV-2 P.1 (Variante Gamma)*	-

Tabela 12. Microrganismos patogênicos de referência utilizados neste estudo.

* Tenha em atenção que a detecção destas estirpes do SARS-CoV-2 não é considerada neste ensaio. Este teste foi concebido para a detecção qualitativa da mutação P681R e da mutação L452R no gene S presente em várias variantes do SARS-CoV-2.

12.4. Reatividade analítica











A reatividade do VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System foi avaliado em relação aos controlos de ARN sintético da variante Kappa (B.1.617.1 Índia/CT-ILSGS00361/2021) e amostras clínicas caracterizadas como variante Delta (B.1.617.2) por sequenciação, mostrando resultados positivos.

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/ Símbolos para componentes IVD e reagentes

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Produto para diagnóstico <i>In vitro</i>	 Keep dry Armazenar em local seco	 Use by Data de validade	 Manufacturer Fabricante	 LOT Batch code (Lot) Código do lote
 Consult instructions for use Consultar as instruções de utilização	 Temperature limitation Limitação de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contém <n> teste(s)	 DIL Sample diluent Diluyente de amostra	 REF Catalog number Número de referência	

Trademarks

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

Change Control / Controlo de alterações		
Version No. / Versão n.º	Changes / Alterações	Date / Data
00	Original version / Versão original.	8/10/2021

Table A 2. Control change table/ Tabela de controlo de alterações.

Revision: 8 Outubro 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

