

**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 / Denna bruksanvisning gäller för följande referens:

PRODUCT / PRODUKT	REFERENCE / REFERENS
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. / Referens för produkt som ska användas 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

## Innehåll

1.	Avsedd användning .....	20
2.	Sammanfattning och förklaring.....	20
3.	Procedurprincip.....	21
4.	Medföljande reagenser.....	21
5.	Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren.....	22
6.	Transport- och förvaringsförhållanden .....	22
7.	Försiktighetsåtgärder.....	22
8.	Testprocedur.....	24
8.1.	Insamling, förvaring och transport av prover .....	24
8.2.	Provberedning och RNA-extraktion .....	24
8.3.	PCR-protokoll.....	25

---

9.	Resultatfolkning .....	28
10.	Testets begränsningar.....	30
11.	Kvalitetskontroll.....	31
12.	Prestandaegenskaper .....	31
12.1.	Klinisk sensitivitet och specificitet .....	31
12.2.	Analytisk sensitivitet .....	33
12.3.	Analytisk specificitet.....	34
12.4.	Analytisk reaktivitet .....	35
	Bibliography/ Bibliografi.....	36
	Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och 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  $8^{\circ}\text{C}$  for up to 72 hours or frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or ideally at  $-70^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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.

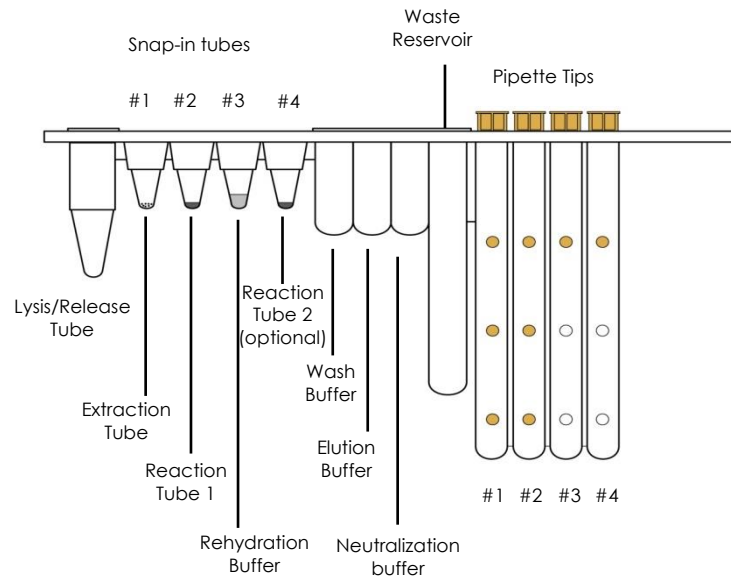
12) Click the "Save Test" button.

### 8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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).
  - a. Remove excess air, and close aluminium pouches with the zip seal.
  - b. 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.
    - i. 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
+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>P681R mutation Detected <sup>1</sup></b>
-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>L452R mutation Detected <sup>1</sup></b>
+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>P681R mutation and L452R mutation Detected <sup>1</sup></b>
-	-	+ <sup>1</sup>	<b>P681R mutation and L452R mutation Not Detected <sup>1</sup></b>
-	-	- <sup>2</sup>	<b>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.<sup>2</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.</b>
INC	INC	INC	<b>Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.</b>

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  $\geq 35$  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 <sup>1</sup>	
		P681R	L452R
<b>B.1.617.1</b>	Kappa	X	X
<b>B.1.617.2</b>	Delta	X	X

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

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

<sup>2</sup>Overview of Variants/Mutations <https://covariants.org/variants> (data up to 02<sup>nd</sup> 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  $\geq 40$  RNA copies/reaction on nasopharyngeal samples and  $\geq 250$  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  $\geq 40$  RNA copies/reaction on nasopharyngeal samples and  $\geq 500$  RNA copies/reaction on saliva samples for L452R mutation.

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

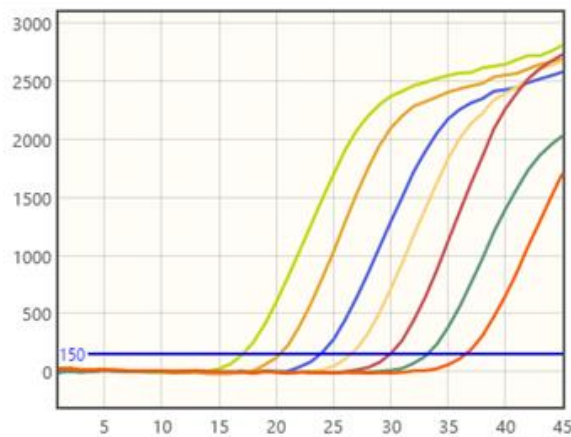
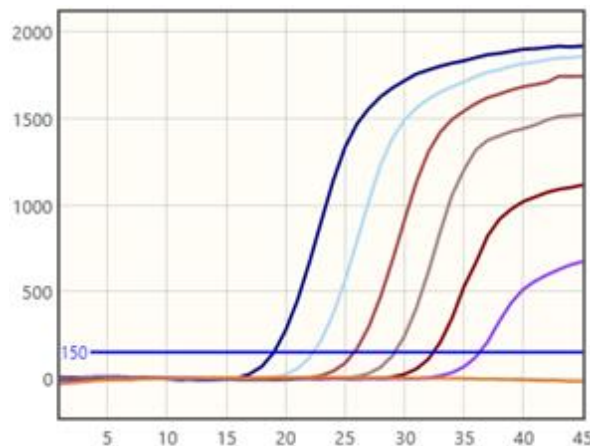


Figure 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (synthetic cDNA) ( $5.3 \times 10^6$  -  $5 \times 10^1$  copies per reaction) template run on the BD MAX™ System (530/565 (HEX) channel).



## 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	-	Pneumocytis 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.

## SVENSKA

---

### 1. Avsedd användning

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är ett automatiserat realtids-RT-PCR-test utformat för kvalitativ detektion av P681R-mutation och L452R-mutation i S-genens RNA från positiva nasofaryngeala och orofaryngeala svabbar och salivprover från positiva SARS-CoV-2-tester.

Analysen är avsedd att användas med SARS-CoV-2-positiva prover eller, i de fall testet utförs tillsammans med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215), med prover från patienter där sjukvårdspersonalen misstänker coronavirussjukdom 2019 (covid-19).

Detta test är avsett att användas som hjälp för att övervaka prevalensen av P681R- eller L452R-mutationer i S-genen och för att bistå i kontrollåtgärder. Analysen använder BD MAX™ System för automatiserad extraktion av RNA och efterföljande realtids-RT-PCR med medföljande reagenser kombinerade med universella reagenser och engångsartiklar för BD MAX™ System. RNA extraheras från prover, och kompletterande DNA (cDNA) syntetiseras och amplifieras med användning av RT-PCR och detekteras med fluorescerande rapportörfärgprober som är specifika för P681R- och L452R-mutationer.

### 2. Sammanfattning och förklaring

Alla virus, inklusive SARS-CoV-2, muterar med tiden. En del förändringar kan påverka virusets egenskaper, exempelvis hur enkelt det sprids, sjukdomens associerade allvarlighetsgrad, eller verkningsgraden hos vacciner, terapeutiska mediciner, diagnosverktyg eller andra folkhälsorelaterade och sociala åtgärder.

Förekomsten av genmutationer är en naturlig och förväntad händelse inom virusets evolutionsprocess. Vissa specifika mutationer definierar de facto genetiska virusgrupper som för närvarande cirkulerar globalt. Tack vare genetisk sekvensering av patogenen på global nivå har det varit möjligt att fastställa virusets spridningsmönster och evolution.

I slutet av 2020 drev framväxandet av varianter med högre risk för folkhälsan på indelningen i Virusvariant av intresse (VOI, Variant of Interest) och Virusvariant av särskild betydelse (VOC, Variant of Concern), för att underlätta för den epidemiologiska kontrollen. Här nedan några av dessa SARS-CoV-2-varianter:

Delta- (virusstam B.1.617.2) och Kappa-varianter (virusstam B.1.617.1) var tätt förknippade med en enorm COVID-19-ökning i Indien under våren 2021. Denna variant har multipla mutationer i spikproteinet, inklusive P681R och L452R. Kappavarianten har också mutationer i spikproteinet, inklusive P681R, L452R och E484Q.

Alla dessa mutationer som beskrivs ovan visar potentiell reduktion avseende neutralisering med hjälp av vissa immunterapier, och minskning av vacciners förväntade effekter eller har identifierats orsaka samhällsspridning.

Det är därför som uppkomsten av varianter som ökar virusets överförbarhet, dess virulens eller som undgår effekten av de neutraliserande antikroppar som genereras efter naturlig infektion eller vaccination, utgör ett folkhälsoproblem av största betydelse som kan ha en väsentlig påverkan på kontrollen av pandemin.

Av denna anledning har VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System utformats för att möjliggöra detektion av de viktigaste mutationerna i anknytning till varianten som hålls under uppsikt.

### 3. Procedurprincip

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är designat för kvalitativ detektion av RNA med P681R- och L452R-mutationer i S-genen i SARS-CoV-2-virus från positiva nasofaryngeala och orofaryngeala svabbar och salivprover. Detektionen utförs med realtids-RT-PCR i ett ettstegsformat, där omvänd transkription och efterföljande amplifiering av den specifika målsekvensen äger rum i samma reaktionsrör. Det isolerade RNA-målet transkriberas, vilket genererar komplementärt DNA via omvänt transkriptas. Detta följs av amplifiering av en konserverad region av SARS-CoV-2-virusets S-gen för P681R-mutation och L452R-mutation med hjälp av specifika primers och fluorescensmärkta prober.

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System baseras på DNA-polymerasets 5' exonukleasaktivitet. Under DNA-amplifieringen klyver detta enzym proben som är bunden till den komplementära DNA-sekvensen, vilket separerar quencher-färgen (släckare) från rapportören. Denna reaktion genererar en ökning av fluorescenssignalen som är proportionell mot mängden av målmall. Denna fluorescens mäts på BD MAX™ System.

Varje rör i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller alla de komponenter som krävs för realtids-PCR-analys (specifika primrar/prober, dNTP, buffert, polymeras och omvänt transkriptas) i stabiliserad form, samt en endogen intern kontroll för att övervaka extraktionsprocessen och/eller inhiberingen av polymerasaktiviteten. Analysen använder en hushållningsgen från människa som en endogen intern kontroll (IC) (human RNase P-gen). Hushållningsgener från människa är involverade i grundläggande cellfunktioner och förväntas därför förekomma i alla kärnförsedda humanceller och bibehålls på relativt konstanta uttrycksnivåer.

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

Tabell 1. Mål, kanal och gener.

### 4. Medföljande reagenser

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System inkluderar följande material och reagenser (anges i tabell 2):

Reagens/material	Beskrivning	Färg eller streckkod	Mängd
SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube	En blandning av enzymer, primrar/prober, buffert, dNTP, stabiliserande medel och endogen intern kontroll i stabiliserad form	Blå folie	2 påsar med 12 genomskinliga rör
Rehydration Buffer tube	Lösning för att bereda den stabiliserade produkten	11-folie	1 påse med 24 genomskinliga rör

Tabell 2. Reagenser och material som medföljer VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med kat. nr VS-VAD124 (444218).

## 5. Reagenser och utrustning som ska tillhandahållas av användaren

Följande lista omfattar material och utrustning som krävs för användning, men som inte medföljer VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

- Realtids-PCR-instrument: BD MAX™ System(Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 eller 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortexblandare.
- Mikropipetter (noggrannhet mellan 2 och 1 000 µl).
- Filterspetsar.
- Puderfria engångshandskar.
- Valfritt: VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215)

## 6. Transport- och förvaringsförhållanden

- Satserna kan transporteras och förvaras vid 2 – 40 °C fram till utgångsdatumet som anges på etiketten.
- Efter att ha öppnat de aluminiumpåsar som innehåller reaktionsrören kan produkten användas i upp till 28 dagar.

## 7. Försiktighetsåtgärder

- Produkten är avsedd att användas enbart av yrkesmässiga användare, exempelvis laboratoriepersonal, sjukvårdspersonal och tekniker, vilka har utbildning i molekylärbioologiska tekniker.
- För *in vitro*-diagnostik.
- Använd inte utgångna reagenser och/eller utgången material.
- Använd inte satsen om etiketten som förseglar den yttre lådan är bruten.
- Använd inte reagenser om den skyddande lådan är öppen eller om förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om de skyddande påsarna är öppna eller om förseglingen är bruten vid ankomst.
- Använd inte reagenser om torkmedel inte finns eller inte har fungerat i reagenspåsar.
- Ta inte ut torkmedel från reagenspåsar.

- Stäng reagensernas skyddande påsar med blixtlåsförseglingen direkt efter varje användning. Avlägsna eventuell luft i påsarna före försegling,
- Använd inte reagenser om folien är bruten eller skadad.
- Blanda inte reagenser från olika påsar och/eller satser och/eller partier.
- Skydda reagenser från fukt. Längre tids exponering för fukt kan påverka produktprestanda.
- Förvara komponenter borta från ljus.
- I fall då andra PCR-tester utförs i samma allmänna område av laboratoriet måste varsamhet iakttas för att säkerställa att VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, ytterligare reagenser som krävs för testning samt BD MAX™ System inte kontamineras. Undvik alltid kontamination av reagenser från mikroorganismer och ribonukleas (RNAs)/deoxyribonukleas (DNAs). Användning av sterila, RNAs/DNAs-fria och aerosolresistenta pipettspetsar eller pipettspetsar av typen positiv förskjutning ("positive displacement") rekommenderas. Använd en ny spets för varje prov. Skyddshandskar måste bytas före hantering av reagenser och kassetter (BD MAX™ PCR Cartridge).
- I syfte att undvika kontamination av miljön med amplikoner ska BD MAX™ PCR Cartridge inte brytas itu efter användning. Tätningarna på BD MAX™ PCR Cartridge är utformade för att förhindra kontamination.
- Utforma ett enkelriktat arbetsflöde. Det bör börja i extraktionsområdet och sedan flytta till amplifierings- och detektionsområdet. Flytta inte prover, utrustning och reagenser tillbaka till området där det föregående steget utfördes.
- Följ god laboratoriesed. Bär skyddskläder, använd engångshandskar, skyddsglasögon och mask. Ät inte, drick inte, rök inte och använd inte smink i arbetsområdet. Tvätta händerna efter att testet har slutförts.
- Prover måste behandlas som potentiellt smittförande och/eller biofarliga, precis som alla reagenser och allt material som har exponerats för proverna. De måste hanteras enligt nationella säkerhetsbestämmelser. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder vid insamling, transport, förvaring, hantering och kassering av prover.
- Prover och reagenser måste hanteras i ett biologiskt säkerhetskåp. Använd personlig skyddsutrustning som uppfyller gällande riktlinjer för hantering av potentiellt smittsamma prover. Kassera avfall enligt lokala och nationella bestämmelser.
- Regelbunden dekontaminering av den utrustning som används ofta rekommenderas, särskilt mikropipetter och arbetsytor.
- I enlighet med direktiv (EG) nr 1907/2006 (REACH) krävs inte materialsäkerhetsdatablad (Safety Data Sheets) för "VIASURE Real Time PCR Detection Kit", pga. dess klassificering som ofarlig för hälsa och miljö, eftersom den inte innehåller ämnen och/eller blandningar som uppfyller kriterierna i direktiv (EG) nr 1272/2008 (CLP), eller förekommer i koncentrationer högre än det värde som fastställts för deklaration enligt nämnda direktiv.
- Om satsen används tillsammans med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215), se tillämplig bruksanvisning.
- Se användarhandboken för BD MAX™ System för ytterligare varningar, försiktighetsåtgärder och procedurer.

## 8. Testprocedur

### 8.1. Insamling, förvaring och transport av prover

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats på nasofaryngeala svabbar och salivprover, båda typerna insamlade 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 och orofaryngeala svabbar insamlade i virustransportmedium (VTM) - Vircell. Andra typer av prover måste valideras av användaren.

Insamling, förvaring och transport av prover ska utföras enligt de villkor som validerats av användaren. I allmänhet ska luftvägsprover och salivprover samlas in och märkas på lämpligt sätt i rena behållare med eller utan transportmedium (beroende på provtyp) och bearbetas så snart som möjligt för att garantera testets kvalitet. Proverna får transporteras vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar enligt lokala och nationella bestämmelser för transport av patogent material. För långvarig transport (mer än 72 timmar) rekommenderar vi transport vid –20 °C eller lägre. Användning av färska prover rekommenderas för testet. Proverna kan förvaras vid 2 till 8 °C i upp till 72 timmar eller frysta vid –20 °C eller helst vid –70 °C för bevarande. Upprepade nedfrysningar och upptiningar bör undvikas för att förhindra nedbrytning av provet och nukleinsyorna.

De nasofaryngeala/orofaryngeala svabbarna och salivproverna måste samlas in, transporteras och förvaras enligt tillämpliga laboratorieriktlinjer. Se CDC:s riktlinje för mer information (Specimen collection guidelines). Webbplats <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> och Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Webbplatsen <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html> och IDSA-riktlinjen (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: uppdaterad 2018 av Infectious Diseases Society of America och American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

### 8.2. Provberedning och RNA-extraktion

Utför provberedning enligt rekommendationerna i bruksanvisningen för extraktionssatsen som används, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Observera att vissa andra prover kan kräva förbearbetning. Tillämpningsspecifika procedurer för extraktionsförberedelse ska utvecklas och valideras av användaren.

Vid användning av nasofaryngeala eller orofaryngeala prover:

1. Pipettera mellan 400 och 750 µl nasofaryngealt/orofaryngealt prov insamlat i virustransportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) System-medium eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i 1 minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.

Vid användning av salivprover insamlade i transportmedium:

1. Salivprover kan samlas in i viralt transportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM) i förhållandet 1:3 (saliv:medium). Vortexa i 1 minut på hög hastighet. Pipettera 750 µl i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ



fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i 1 minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.

Om små salivprover används:

1. Kombinera saliv med viralt transportmedium (VTM), BD™ Universal Viral Transport (UVT) eller IMPROVIRAL™ Viral Preservative Medium (VPM), så att det slutliga förhållandet saliv:medium är 1:3. Vortexa i 1 minut på hög hastighet. Pipettera sedan 750 µl i ett BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube och stäng röret med ett membranlock. Säkerställ fullständig blandning genom att vortexa provet vid hög hastighet i 1 minut. Fortsätt till drift av BD MAX™ System Operation.

### 8.3. PCR-protokoll

Obs! Se användarhandboken för BD MAX™ System för detaljerade anvisningar.

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

Obs! Om du redan har skapat testet för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System kan du hoppa över steg 8.3.1 och gå direkt till 8.3.2.

- 1) Välj fliken "Test Editor" (Testredigerare) på skärmen "Run" (Kör) på BD MAX™ System.
- 2) Klicka på knappen "Create" (Skapa).
- 3) Döp testet, dvs. VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R), i fönstret "Test Name" (Testnamn) på fliken för grundläggande II(+) information.
- 4) Välj "ExK TNA-3" i listrutan "Extraction Type" (Extraktionstyp).
- 5) Välj "Type 5" (Typ 5) i listrutan "Master Mix Format" (Masterblandningsform).
  - a. Obs! Produkterna kan användas tillsammans med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215). Välj sedan "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)).
- 6) Välj "User defined" (Användardefinierad) i "Sample extraction parameters" (Provextraktionsparametrar) och justera provvolymen till 950 µl.
- 7) Välj "Call Ct at Threshold Crossing" (Hämta Ct vid tröskelvärdesgräns) i "Ct Calculation" (Ct-beräkning).
- 8) Välj följande konfiguration i "Custom Barcodes" (Anpassa streckkoder) om du kör programvaruversion 5.00 eller senare:
  - a. "Snap-In 2 Barcode" (Streckkod för rör 2): Lämna tom (när det gäller SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube krävs ingen streckkodskonfigurering).
  - b. "Snap-In 3 Barcode" (Streckkod för rör 3): 11 (gällande Rehydration Buffer tube).
  - c. "Snap-In 4 Barcode" (Streckkod för rör 4): 1G om det används tillsammans med SARS-CoV-2 (N1 + N2) reaction tube och formatet "Dual Master mix Concentrated Lyophilized MM with

rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)), (avsnitt 8.3.1).

- 9) Ange följande parametrar på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar): "Channel Settings" (Kanalinställningar), "Gains" (Förstärkningar) och "Threshold" (Tröskelvärde) (tabell 3).
- a. Obs! Produkterna kan användas tillsammans med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System (ref: 444215). "PCR Settings" och "Test Steps" ska fyllas i för Snap-In 4 (blå) position (se tillämplig bruksanvisning).

Channel (Kanal)	Alias (Alias)	Gain (Förstärkning)	Threshold (Tröskelvärde)	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-inställningar).

Obs! Det rekommenderas att ställa in de minimitröskelvärden som anges ovan för varje kanal som en startpunkt. De slutliga inställningarna måste dock fastställas av slutanvändaren under resultatutvärderingen. Detta för att säkerställa att tröskelvärdena faller inom fluorescenskurvornas exponentiella fas och över eventuell bakgrundssignal. Tröskelvärdet för olika instrument kan variera på grund av olika signalintensiteter.

- 10) Ange även följande parametrar "Spectral Cross Talk" (Spektral överhörning) på fliken "PCR settings" (PCR-inställningar) (tabell 4).

		False Receiving Channel (Falsk mottagarkanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Excitationskanal)	475/520	-	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	530/565	1,0	-	0,0	0,0	0,0	0,0
	585/630	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
	630/665	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	680/715	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0

Tabell 4. Parametrar för "Spectral Cross Talk" (spektral överhörning).

- 11) Ange PCR-protokollet på fliken "Test Steps" (Teststeg) (tabell 5).

Step Name (Stegnamn)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Cykler)	Time (s) (Tid (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Reverse transcription (Omvänd transkription)	Uppehåll	1	900	45 °C	-
Initial denaturation (Inledande denaturering)	Uppehåll	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturering och hybridisering/förlängning (datainsamling))	2-temperatur	45	10	95 °C	-
			61,1	63 °C	✓

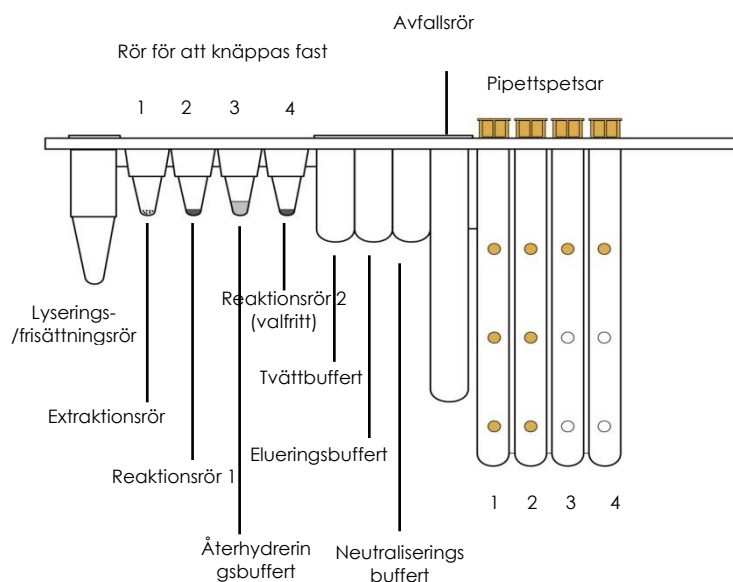
Tabell 5. PCR-protokoll.

- 12) Klicka på knappen "Save Test" (Spara test).

### 8.3.2. Installation av BD MAX™-ställ

- 1) För varje prov som ska testas ska du ta ut en Unitized Reagent Strips från BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Knacka försiktigt varje remsa mot en hård yta för att säkerställa att alla vätskor finns på rörens botten och ladda den på provrörsstället för BD MAX™ System.
- 2) Ta ut nödvändigt antal BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (vit folie) från den skyddande påsen. Knäpp fast extraktionsrören (vit folie) på motsvarande positioner på TNA-remsan (rörposition 1, vit färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
- 3) Bestäm och separera lämpligt antal reaktionsrör för SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) reaction tube (blå folie). Knäpp fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 2, grön färgkodning på stället, se figur 1).
  - a. Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.
  - b. Utför en korrekt rehydrering genom att se till att den frystorkade produkten finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
    - i. Obs! Om du väljer formatet "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Dubbel masterblandning – koncentrerad frystorkad masterblandning med återhydreringsbuffert (typ 5)) (avsnitt 8.3.1) ska du bestämma och separera lämpligt antal ytterligare SARS-CoV-2 reaction tubes (1G-folie för VIASURE SARS-CoV-2 (N1+N2)-testet) och knäppa fast dem på motsvarande positioner på remsan (rörposition 4, blå färgkodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng aluminiumpåsarna med blixtlåsförseglingen.
- 4) Ta ut lämpligt antal Rehydration Buffer tube (11-folie) och knäpp fast rören på motsvarande positioner på remsan (rörposition 3, färglös kodning på stället, se figur 1). Avlägsna överskott av luft och stäng påsen med blixtlåsförseglingen.
  - a. Utför en korrekt överföring genom att se till att vätskan finns på rörets botten och att den inte klibbar fast på rörets övre del eller på folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all buffert hamnar på botten av röret.

Figur 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) från BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Inställning av BD MAX™-instrument

- 1) Välj fliken "Work List" (Arbetslista) på skärmen "Run" (Kör) i programvara v4.50A eller senare för BD MAX™ System.
- 2) I listrutan "Test" väljer du VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) (se avsnitt 8.3.1 om det inte redan har skapats).
- 3) Välj lämpligt satslotnummer (finns angivet på den använda extraktionssatsens ytterlåda) från listrutan (valfritt).
- 4) Ange Sample Buffer Tube-identifikationsnumret i fönstret för provrör i arbetslistan, antingen genom att läsa av streckkoden med en streckkodsläsare eller genom manuell inmatning.
- 5) Fyll i fönstret för prov-/patient-ID och/eller accession i arbetslistan och klicka på knappen "Save" (Spara). Fortsätt tills alla Sample Buffer Tubes har angivits. Säkerställ att prov-/patient-ID och Sample Buffer Tubes nogga överensstämmer.
- 6) Placera det förberedda Sample Buffer Tube i BD MAX™ Rack(s).
- 7) Ladda stället/ställen i BD MAX™ System (ställ A är positionerat på den vänstra sidan av BD MAX™ System och ställ B på dess högra sida).
- 8) Placera lämpligt antal BD MAX™ PCR Cartridge i BD MAX™ System.
- 9) Stäng luckan på BD MAX™ System.
- 10) Klicka på "Start Run" (Starta körning) för att påbörja proceduren.

### 8.3.4. BD MAX™-rapport

- 1) Klicka på knappen "Results" (Resultat) i huvudmenyn.
- 2) Dubbelklicka antingen på din körning i listan eller tryck på knappen "view" (visnings).
- 3) Klicka på "Print" (Skriv ut) och välj: "Run Details, Test Details and Plot..." (Körningsinformation, testinformation och kurva ...).
- 4) Klicka på knappen "Print or Export" (Skriv ut eller exportera) på skärmen "Run Reports" (Körningsrapport).

## 9. Resultattolkning

Se användarhandboken för BD MAX™ System för en detaljerad beskrivning av dataanalys.

Analys med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System är avsedd att utföras som en reaktion på prover med positiva resultat för SARS-CoV-2-RNA. Om det används tillsammans med VIASURE SARS-CoV-2 (N1 + N2) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System på prover av okänd status för närvaro av SARS-CoV-2-RNA, se dess bruksanvisning för användning för resultattolkning för fastställande av SARS-CoV-2-RNA-resultat.

Dataanalys utförs av BD MAX™-programvaran enligt tillverkarens anvisningar. BD MAX™-programvaran rapporterar Ct-värden och amplifieringskurvor för varje detektorkanal för varje testat prov på följande sätt:

– Ct-värde på 0 anger att det inte fanns något Ct-värde beräknat av programvaran med det specificerade tröskelvärdet (se tabell 3). Amplifieringskurvan för provet med ett Ct-värde på 0 måste kontrolleras manuellt.

- Ct-värde på -1 anger att ingen amplifieringsprocess har inträffat.
- Ett annat Ct-värde ska tolkas i korrelation med amplifieringskurvan och enligt riktlinjerna för provtolkning som finns i tabell 6.

Kontrollera signalen för den interna kontrollen för att bekräfta korrekt funktion av amplifieringsblandningen. Kontrollera dessutom att det inte föreligger någon rapport om fel på BD MAX™ System.

Resultat bör avläsas och analyseras med hjälp av följande tabell:

P681R-mutationsmål (475/520)	L452R-mutationsmål (530/565)	Endogen intern kontroll (585/630)	Tolkning
+	-	+/- <sup>1</sup>	<b>P681R-mutation detekterad <sup>1</sup></b>
-	+	+/- <sup>1</sup>	<b>L452R-mutation detekterad <sup>1</sup></b>
+	+	+/- <sup>1</sup>	<b>P681R-mutation och L452R-mutation detekterad <sup>1</sup></b>
-	-	+ <sup>1</sup>	<b>P681R-mutation och L452R-mutation ej detekterad <sup>1</sup></b>
-	-	- <sup>2</sup>	<b>Olösta resultat (UNR) erhålls när det förekommer inhibitorer i PCR-reaktionen eller när ett allmänt problem (som inte rapporterats av en felkod) inträffar under bearbetningen av provet och/eller amplifieringen.<sup>2</sup></b>
IND	IND	IND	<b>Obestämt analysresultat (IND). Beror på fel på BD MAX™ System. Analysresultat som visas vid instrumentfel som är kopplade till en felkod.</b>
INC	INC	INC	<b>Ofullständigt analysresultat (INC). Beror på fel på BD MAX™ System. Analysresultat som visas om körningen inte kan slutföras.</b>

Tabell 6. Provtolkning.

+: Amplifiering inträffade.

-: Ingen amplifiering inträffade.

**1** Ett prov anses vara positivt om Ct-värdet som erhålls är lägre än 40. Den endogena interna kontrollen (IC) kan eller kan inte uppvisa en amplifieringssignal. Ibland är IC-detektion inte nödvändig eftersom ett stort antal kopior av målsekvensen kan orsaka föredragen amplifiering av målspecifika nukleinsyror.

**2** IC måste uppvisa en amplifieringssignal med Ct lägre än 35 om P681R-mutations- och L452R-mutationsmålställena är negativa. Ct-värdet kan variera i mycket hög grad på grund av att den endogena interna kontrollen är en hushållningsgen från människa som bör förekomma i alla kärnförsedda humanceller i det ursprungliga provet. Om det inte förekommer någon signal eller om Ct-värdet är  $\geq 35$  för den endogena interna kontrollen anses resultatet vara "Unresolved" (Olöst) och omtestning krävs.

Sammanfattning av mutationer associerade med följande linjer, vilka förekommer i de mest kända virusvarianterna av särskild betydelse (Variants of Concern, VOC):

Linjer	WHO-etikett	Mutationer i S-genen <sup>1</sup>	
		P681R	L452R
<b>B.1.617.1</b>	Kappa	X	X
<b>B.1.617.2</b>	Delta	X	X

Tabell 7. Sammanfattning av mutationer associerade med kända virusvarianter av särskild betydelse (Variants of Concern, VOC).

<sup>1</sup>Spårning av SARS-CoV-2-varianter: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (data fram till 2 september 2021).

<sup>2</sup>Översikt av varianter/mutationer: <https://covariants.org/variants> (data fram till 2 september 2021).

Andra varianter kan uppvisa mutationerna P681R och L452R, då de inte är specifika för nämnda varianter.

### **Slutgiltig tilldelning till en linje måste göras genom sekvensering.**

Om ett tvetydigt resultat visas kontinuerligt rekommenderas att konsultera bruksanvisningen, granska den använda extraktionsprocessen, verifiera korrekt prestanda för varje RT-qPCR-steg och granska parametrarna, samt att kontrollera den sigmoida formen på kurvan och fluorescensintensiteten.

Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.

## **10. Testets begränsningar**

- Resultat av testet bör utvärderas av sjukvårdspersonal med beaktande av medicinsk anamnes, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Även om denna analys kan användas med andra typer av prover har den validerats med nasofaryngeala/orofaryngeala svabbar och salivprover.
- Den frystorkade produkten ska finnas i botten av röret för god testprestanda och inte häfta fast vid rörets överdel eller folieförseglingen. Knacka försiktigt varje rör mot en hård yta för att se till att all produkt hamnar på botten av röret.
- Testets funktion påverkas inte om reaktionsblandningen i stabiliserad form, vanligtvis i botten av röret, inte ser ut som vanligt (utan konisk form, icke-homogen, mindre/större i storlek och/eller annan färg än vit).
- Testets kvalitet beror av provets kvalitet. Extraktion av nukleinsyra från luftvägsprover måste ske på lämpligt sätt.
- Detta test är kvalitativt och ger inga kvantitativa värden och anger inte antalet förekommande organismer.
- Extremt låga nivåer av mål under detektionsgränsen kan detekteras, men resultaten är kanske inte reproducerbara.
- Prover med ett Ct-värde mellan 35 och 40 kan uppvisa större variationer bland de erhållna resultaten.
- Det finns en risk för falskt positiva resultat på grund av korskontamination av prover som antingen innehåller höga koncentrationer av mål-RNA från SARS-CoV-2 RNA med P681R-mutation eller L452R-mutation i S-genen - eller kontamination orsakad av PCR-produkter från tidigare reaktioner.
- Den specifika kombinationen av primer/prob för detektion av P681R-mutation och L452R-mutation som används i VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System uppvisar inte signifikanta kombinerade homologier med humangenom, humanmikroflora eller andra coronavirus, vilket kan resultera i förutsägbart falskt positivt resultat.
- Falskt negativa resultat kan inträffa på grund av flera faktorer och kombinationer av dessa, inklusive:
  - Olämplig insamling, transport, förvaring och/eller hantering av prover.
  - Olämpliga processförfaranden (inklusive RNA-extraktion).
  - Nedbrytning av virus-RNA under provtransport/-förvaring och/eller -bearbetning.
  - Mutationer eller polymorfismer i primer- eller probbindande regioner kan påverka detektion av nya eller okända SARS-CoV-2-varianter.

- En virusbelastning i provet under analysens detektionsgräns.
- Förekomsten av RT-qPCR-inhibitorer eller andra typer av störande ämnen. Inverkan av vacciner, antivirala läkemedel, antibiotika, cellgifter eller immunsänkande läkemedel som används för att förhindra covid-19 eller som används under behandlingen av infektionen har inte utvärderats.
- Underlåtelse att följa bruksanvisningar och analysförfarandet.
- Vissa prover uppvisar kanske inte *RNase P*-amplifieringskurvor på grund av lågt humancellantal i det ursprungliga kliniska provet. Ett negativt IC-resultat utesluter inte förekomsten av P681R-mutation eller L452R-mutation i ett kliniskt prov.
- Ett positivt testresultat anger inte nödvändigtvis förekomsten av livskraftiga virus och antyder inte att dessa virus är smittsamma eller orsakar kliniska symtom. Ett positivt resultat anger dock förekomsten av virusmålsekvenser.
- Förekomst av P681R- och L452R-mutationer associeras med varianterna Kappa (virusstam B.1.617.1) och Delta (virusstam B.1.617.2). Slutlig stamtilldelning måste dock ske genom sekvensering.
- Negativa resultat utesluter inte förekomst av SARS-CoV-2 RNA, eftersom denna analys är avsedd att användas med positiva SARS-CoV-2-prover.
- Om resultaten blir olösta, obestämda eller ofullständiga med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System krävs omtestning. Olösta prover kan orsakas av förekomsten av inhibitorer i provet eller en inkorrekt återhydrering av röret med frystorkad reaktionsblandning. Om det föreligger ett instrumentfel kommer obestämda eller ofullständiga resultat att erhållas.

## 11. Kvalitetskontroll

VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System innehåller en endogen intern kontroll (IC) i varje reaktionsrör som bekräftar korrekt prestanda för tekniken.

## 12. Prestandaegenskaper

### 12.1. Klinisk sensitivitet och specificitet

Den kliniska prestandan hos VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har testats med hjälp av kliniska prover (nasofaryngeala svabbar) som redan identifierats som positiva eller negativa SARS-CoV-2-prover från patienter. Resultaten var enligt följande:

	Plats	Provtyp	Arbetsflöde	Mål
1	CerTest Biotec S.L (Zaragoza, Spanien)	Nasofaryngeal svabb	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	P681R-mutation
				L452R-mutation

Tabell 8. Plats, provtyp, arbetsflöde och mål.

Sanna positiva och negativa värden, falska positiva och negativa värden, känslighet och specificitet för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System beräknades i relation till respektive jämförelseanalys, i enlighet med följande tabell:

Plats	Komparatoranalys	Mål	TP	TN	FP	FN	Känslighet	Specificitet
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit/ VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit molekylär analys + sekvensering	P681R-mutation	99	98	0	1	99% (93 – 99)	100% (95 – 100)
		L452R-mutation	92	98	0	8	92% (84 – 96)	100% (95 – 100)

Tabell 9. Sanna positiva (TP) och negativa värden (TN), falska positiva (FP) och negativa värden (FN), känslighet, specificitet för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

För att utvärdera jämförbarheten mellan olika provmatriser (nasofaryngeal svabb, orofaryngeal svabb och nasofaryngeal/orofaryngeal svabb i virustransportmedium (VTM) från Vircell), har en jämförande studie gjorts. De erhållna resultaten visade att de tre olika provmatriserna var kompatibla med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

Den preliminära kliniska prestandan för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med salivprover utvärderades. Negativa enskilda salivprover i vilka en känd koncentration av syntetiskt cDNA-fragment för P681R-mutation och L452R-mutation i S-genen tillhörande SARS-CoV-2 testades. Utvärderingen var utformad att utföras med 20 positiva prover (10 prover 2xLoD och 10 prover 10xLoD) samt 10 negativa prover. Analysen gjordes med en 750 µl provvolym för varje tillstånd tillsatt i Sample Buffer Tube (SBT) i TNA-3 Extraction Kit, och det kördes i fullt processläge (automatiserad extraktion och PCR-amplifiering) med BD MAX™ ExK™ TNA-3.

Överensstämmelseandelen i procent beräknades i relation till det förväntade resultatet för varje enskilt prov, och resultaten visas i följande tabell.

Salivprov	Överensstämmelse
Positiva prover	95%
Negativa prover	100%

Tabell 10. Procentandel kompatibilitet mellan VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System och salivprov.

Dessutom utfördes en komparativ analys av nasofaryngeala svabbar och salivprover för att man skulle utvärdera den kliniska prestandan hos VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med salivprover. Sju salivprover och deras motsvarande nasofaryngeala prov analyserades och jämfördes under till hundra procent överensstämmande förhållanden. Båda mutationerna (P681R och L452R) detekterades i de sex salivproverna som identifierats som Delta-varianter.

Mål	TP	TN	FP	FN	Känslighet	Specificitet
P681R-mutation	6	1	0	0	100% (51 – 100)	i.u.*
L452R-mutation	6	1	0	0	100% (51 – 100)	i.u.*

Tabell 11. Sanna positiva (TP) och negativa värden (TN), falska positiva (FP) och negativa värden (FN), känslighet, specificitet för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

\* På grund av den begränsade tillgången på negativa prover kunde beräkningen av testets specificitet inte genomföras.



Sammanfattat var salivprover kompatibla med VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

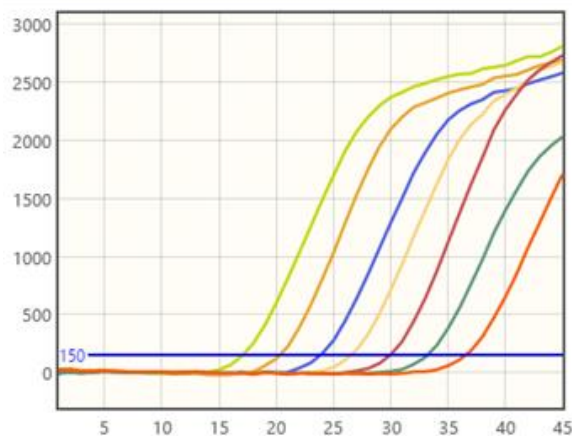
Resultaten visar att mutationerna P681R och L452R detekteras med hjälp av VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System.

## 12.2. Analytisk sensitivitet

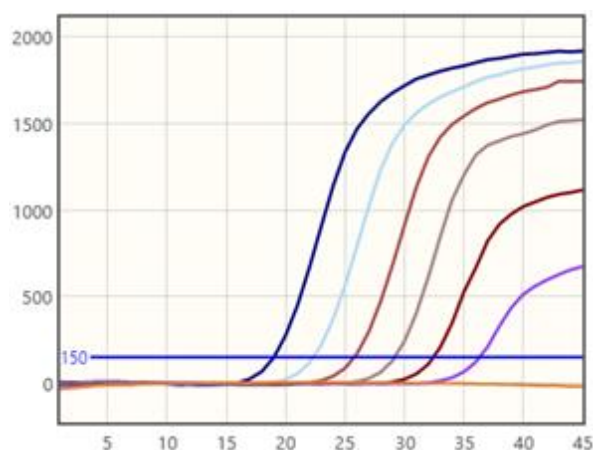
Detektionsgränsresultaten (LoD) för VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System med andel positiva på  $\geq 95\%$  är följande:

- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en detektionsgräns (LoD) på  $\geq 40$  RNA-kopior/reaktion på nasofaryngealprover och  $\geq 250$  RNA-kopior/reaktion på salivprover för P681R-mutationen.
- VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System har en detektionsgräns (LoD) på  $\geq 40$  RNA-kopior/reaktion på nasofaryngealprover och  $\geq 500$  RNA-kopior/reaktion på salivprover för L452R-mutationen.

Figur 2. Spädningsserier för SARS-CoV-2 Variant II (P681R-mutation) (syntetiskt cDNA) ( $5.3 \cdot 10^6$  -  $5 \cdot 10^1$  genomkopior per reaktion) - genmall för körning på BD MAX™ System (475/520 (FAM)-kanal).



Figur 3. Dilution series of SARS-CoV-2 Variant II (L452R mutation) (syntetiskt cDNA) ( $5.3 \cdot 10^6$  -  $5 \cdot 10^1$  genomkopior per reaktion) - genmall för körning på BD MAX™ System (530/565 (HEX)-kanal).



### 12.3. Analytisk specificitet

SARS-CoV-2 Variant II (P681R + L452R)-analysens specificitet bekräftades genom att testa en panel av olika mikroorganismer som representerar de vanligaste respiratoriska patogenerna. Ingen korsreaktivitet detekterades mellan någon av de mikroorganismer som testades:

Test av korsreaktivitet					
Typer av humant adenovirus 1–5, 8, 15, 31, 40 och 41	-	Influenzavirus A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Humant parainfluenzavirus 1, 2, 3 och 4	-
Bocavirus	-	Influenzavirus A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Pneumocytis jirovecii typ A1 och g885652	-
Bordetella bronchiseptica	-	Influenzavirus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	Humant rhinovirus	-
Bordetella holmesii	-	Influenzavirus A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	Respiratoriskt syncytialvirus (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 genotyp A och C	-	Influenzavirus A/South Australia/55/2014, IVR-175	-	SARS coronavirusstam Frankfurt 1	-
Chlamydophila pneumoniae CM-1	-	Influenzavirus B/Phuket/3073/2013	-	Human 2019-nCoV-stam BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1*	-
Humant coronavirus 229E, OC43, NL63 och HKU1	-	Influenzavirus B/Florida/04/06	-	Human 2019-nCoV-stam 2019-nCoV/Italy-INMI1*	-
MERS Coronavirus	-	Legionella bozemanii	-	MT007544.1 (SARS-CoV-2-isolat Australia/VIC01/2020)*	-
Enterovirus Cocksackievirus A24, A9 och B3	-	Legionella dumoffii	-	MN908947.3 (SARS-CoV-2-isolat Wuhan-Hu-1)*	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Legionella longbeachae	-	SARS-CoV-2-stam 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*	-
Influenzavirus A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	Humant metapneumovirus A och B	-	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*	-
Influenzavirus A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	Moraxella catarrhalis	-	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 virusstammar (Alpha variant) *	-
Influenza A/California/7/2009(H1N1) pdm09-virus	-	Mycoplasma pneumoniae	-	SARS-CoV-2 B.1.351 virusstam (Betavariant) *	-
Influenzavirus A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	Mycobacterium tuberculosis	-	SARS-CoV-2 P.1 virusstam (Gammavariant) *	-

Tabell 12. Patogena referensmikroorganismer som använts i denna studie.

\* Observera att detektionen av dessa SARS-CoV-2-stammar inte har beaktats i denna analys. Det här testet är utformat för kvalitativ detektion av P681R-mutation och L452R-mutation i den S-gen som förekommer i ett antal SARS-CoV-2-varianter.

## 12.4. Analytisk reaktivitet











Reaktiviteten hos VIASURE SARS-CoV-2 Variant II (P681R+L452R) Real Time PCR Detection Kit for BD MAX™ System utvärderades mot syntetiska RNA-kontroller från Kappa-varianten (B.1.617.1 Indien/CT-ILSGS00361/2021) och kliniska prover som identifierats som Delta-variant (B.1.617.2) genom sekvensering, och uppvisande positiva resultat.

## Bibliography/ Bibliografi

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed June 2021.
4. Chen N. *et al.*. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. *et al.* Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed June 2021.
7. Lu R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed August 2021.
10. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed June 2021.
11. Yan Y *et al.* Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
12. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed June 2021.
13. Chu D.K.W. *et al.* Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
14. Corman V.M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed June 2021.
16. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.
17. McBride R. *et al.* The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
18. Sheikh A. *et al.* Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.

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

## Symbols for IVD components and reagents/ Symboler för IVD-komponenter och reagenser

 <i>In vitro</i> diagnostic device <i>In vitro</i> -diagnostik	 Keep dry Håll torrt	 Use by Utgångsdatum	 Manufacturer Tillverkare	 Batch code (Lot) Satskod (lot)
 Consult instructions for use Se bruksanvisningen	 Temperature limitation Temperaturgräns	 Contains sufficient for <n> test Innehåller tillräckligt för <n> tester	 Sample diluent Provspädning	 Catalog number Katalognummer

## Trademarks

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

Change Control / Ändringskontroll		
Version No. / Versionsnr.	Changes / Ändringar	Date / Datum
00	Original version / Originalversion.	26/10/2021

Table A 2. Control change table/ Kontrolländringstabell.

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](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

