

Vitassay qPCR

SARS-CoV-2

PCR en tiempo real para la detección cualitativa del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias

Real-time PCR kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 permite la detección cualitativa de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real en muestras respiratorias (frotis nasofaríngeos y orofaríngeos) y muestras de saliva. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por SARS-CoV-2.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, low profile	7041046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, high profile	7042046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 8 x 8-well strip, low profile	7081046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 8 x 8-well strip, high profile	7082046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 96-well plate, low profile	7091046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 96-well plate, high profile	7092046

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041046, 7042046, 7081046 y 7082046:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S046/ 7042S046	SARS-CoV-2 strips	-	4/8 tiras de 8 pocillos
7C046	SARS-CoV-2 Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4/8 tiras de 8 tapones

Reactivos suministrados para las referencias 7091046 y 7092046:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P046/ 7092P046	SARS-CoV-2 Plate	-	1 placa
7C046	SARS-CoV-2 Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	12 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación.

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR en tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los coronavirus son virus ARN monocatenarios no segmentados que pertenecen a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales*. Previamente se han identificado seis tipos de CoV humanos: NL63, 229E, OC43 y HKU1 que causan enfermedad del tracto respiratorio superior y síntomas de resfriado común y el coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS- CoV) que son altamente patógenos en humanos, con altas tasas de neumonía severa y desenlace fatal.

En diciembre de 2019, se informó un grupo de casos de neumonía en un mercado mayorista de mariscos en Wuhan, provincia de Hubei, que se descubrió que era causado por coronavirus previamente desconocidos. Se utilizaron células epiteliales de las vías respiratorias de pacientes infectados para aislar el nuevo coronavirus, llamado temporalmente 2019-nCoV. Más tarde, se descubrió que el nuevo coronavirus está relacionado con el SARS-CoV pero es lo suficientemente divergente del SARS-CoV como para ser considerado un nuevo betacoronavirus que infecta a los humanos. Por ello, el Comité Internacional para la Clasificación de Virus designó el nombre de este coronavirus como coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2). La Organización Mundial de la Salud ha denominado la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 como enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19).

Las personas con COVID-19 han informado de una amplia gama de síntomas, que van desde síntomas leves hasta enfermedades graves. Los síntomas incluyen fiebre o escalofríos, tos, falta de aire o dificultad para respirar, fatiga, dolores musculares o

corporales, dolor de cabeza, pérdida del gusto o del olfato, dolor de garganta, congestión o secreción nasal, náuseas o vómitos y diarrea. Los síntomas pueden aparecer de 2 a 14 días después de la exposición al virus. Las personas mayores y aquellas con problemas médicos subyacentes como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad grave y la infección puede progresar a neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda e insuficiencia multiorgánica. La tasa de mortalidad varía del 3% al 4%.

La COVID-19 puede transmitirse de persona a persona a través de varias rutas diferentes. El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de gotitas de saliva o secreciones nasales cuando una persona infectada tose o estornuda, pero también por contacto directo con un sujeto infectado o contacto indirecto (a través de la transferencia del virus a través de las manos desde los objetos contaminados a la boca, nariz u ojos). La transmisión de este virus se produce de persona a persona, incluso durante el período de incubación asintomático.

La OMS recomienda, para todos los casos sospechosos, la recolección de muestras de las vías respiratorias superiores (URT) (nasofaríngeas y orofaríngeas) para su análisis mediante RT-PCR y, cuando persista la sospecha clínica y las muestras de URT sean negativas, recolectar muestras de las vías respiratorias inferiores (LRT) cuando estén disponibles (esputo expectorado o aspirado endotraqueal / lavado broncoalveolar en pacientes ventilados). Se pueden recolectar muestras clínicas adicionales ya que se ha detectado el virus COVID-19 en sangre, heces, orina y saliva.

Las pruebas de diagnóstico para el SARS-CoV-2 se realizan actualmente mediante escáner de tórax, secuenciación del genoma completo y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (rRT-PCR).

Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona de los genes *ORF1ab* y *N* del virus SARS-CoV-2. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido, de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de SARS-CoV-2 se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'-3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es

proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana del gen *ORF1ab* es detectada en el canal FAM, la amplificación de la secuencia diana del gen *N* es detectada en el canal ROX mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

Las muestras de pacientes deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Para muestras respiratorias los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (Roche).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit, utilizando el instrumento MagCore® HF16 automated Nucleic Acid Extractor System.

mSample Preparation Systems RNA, utilizando el sistema de extracción automatizado Abbott m2000 RealTime System (Abbott Molecular).

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

EMAG®Nucleic Acid Extraction System (bioMérieux, Inc).

Para muestras de saliva los siguientes kits de extracción han sido validados:

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del SARS-CoV-2 Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etap	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	45°C	15 min	1
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (gen *ORF1ab*), ROX (gen N) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM y ROX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct \geq 40 o no señal) de FAM y de ROX.

El Control Interno (IC) debería mostrar una señal de amplificación (Ct \leq 40 en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo)).

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados de las muestras:

Gen ORF1ab (FAM)	Gen N (ROX)	Control Interno HEX	Interpretación	
+	+	+/-*	Válido	RNA SARS-CoV-2 Detectado
+	-	+/-*	No concluyente	Si únicamente amplifica un gen diana de SARS-CoV-2, repita el ensayo en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada. Tras repetir la prueba una vez, si al menos un gen diana resulta positivo, la muestra debe considerarse positiva para SARS-CoV-2.
-	+	+/-*	No concluyente	
-	-	+ [#]	Válido	RNA SARS-CoV-2 No detectado [#]
-	-	- [#]	Inválido	Test fallido [#]

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

* En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

[#] En el caso de que la detección de las regiones diana de SARS-CoV-2 resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 40. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct \geq 40 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En un estudio se analizaron un total de 100 muestras respiratorias (frotis nasofaríngeos) procedentes de pacientes sintomáticos con sospecha de COVID-19, mediante PCR en tiempo real usando Vitassay qPCR SARS-CoV-2 y los resultados se compararon con los obtenidos con un método de detección molecular empleado en el centro nacional de referencia (ISCI). SARS-CoV-2 fue detectado en las 2 muestras positivas mediante Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

En otra evaluación clínica de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 se analizaron 409 muestras respiratorias (hisopos nasofaríngeos) de pacientes con sospecha de enfermedad COVID-19, mediante PCR en tiempo real usando Vitassay qPCR SARS-CoV-2 y los resultados se compararon con los previamente obtenidos con el método de detección molecular Abbott Real Time SARS-CoV-2 assay (Abbott Molecular). SARS-CoV-2 fue detectado en 145 muestras positivas mediante Vitassay qPCR SARS-CoV-2. Se obtuvieron 8 muestras discordantes pero la baja cantidad de ARN molde en estas muestras respiratorias está por debajo del límite de detección del método utilizado. Estas muestras resultaron también negativas mediante una prueba desarrollada de acuerdo con los cebadores y sondas de panel rRT-PCR en tiempo real del 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) (protocolo del CDC de EE. UU.).

Además, se realizó otra evaluación clínica de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 con 28 muestras anonimizadas de saliva y frotis orofaríngeos en paralelo de pacientes con signos y síntomas de infección COVID-19. Los valores obtenidos con las muestras orofaríngeas se tomaron como valores de referencia. SARS-CoV-2 fue detectado en 18 muestras de saliva de las 19 muestras positivas detectadas en frotis orofaríngeos

mediante Vitassay qPCR SARS-CoV-2. El análisis de las muestras de saliva en paralelo mostró resultados similares a los esperados.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar SARS-CoV-2 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de SARS-CoV-2 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 20 copias genómicas por reacción para los genes *ORF1ab* y *N* con una tasa de positividad del 95%.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de SARS-CoV-2 fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Virginia/ATCC2/2009 (H1N1)pdm09	Metapneumovirus humano A, B y 8 Peru6-2003
<i>Candida albicans</i> 3147	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A y C	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1 y TWAR cepa 2023	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	Parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4 virus
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS Coronavirus	Influenza A/Wisconsin/15/2009 (H3N2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1LAC
SARS Coronavirus Cepa Frankfurt 1	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	Rhinovirus humano tipo C y 17
Enterovirus 68, 71 y D68 US/MO/1418947	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Enterovirus Echovirus 11 y 30	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa RP62A
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	Influenza B/Florida/04/06 virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022 y cepa TIGR4
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA y Rd	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	<i>Streptococcus pyogenes</i> typing cepa T1
Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 14, 15, 31, 40 y 41	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Salivarius</i> cepa DSM 13084
Bocavirus humano	<i>Legionella dumoffii</i>	Virus respiratorio sincitial (VRS) A y B
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus		

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando RNA extraído a partir de los virus Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV cepa 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 cepa hCoV-19/Netherlands/Diemen_1363454/2020 y controles de RNA sintético para dos variantes del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) y MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I
- Mic Real Time PCR Cycler bms ^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y Mic Real Time PCR Cycler bms. el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por SARS-CoV-2. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo y orofaríngeo) y muestras de saliva. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con SARS-CoV-2, ya sea por el gran número de copias de cDNA molde que

contiene cada vial SARS-CoV-2 Positive Control, muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

- Vitassay qPCR SARS-CoV-2, diseñado para la detección específica de SARS-CoV-2, no mostró mayormente homologías combinadas significativas con el genoma humano, otros coronavirus o microflora humana que pudieran predecir posibles resultados falsos positivos de la reacción RT-qPCR (con la excepción de algunas secuencias del N y/o ORF1ab de SARS-CoV, y de otros coronavirus identificados en murciélago y pangolín).
- La detección del SARS-CoV-2 puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de RNA); c) Degradación del RNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana del genoma del SARS-CoV-2 identificadas por este test que pueden provocar que el RNA sea indetectable e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la retrotranscripción y/o amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores relacionados con COVID-19); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La amplificación de una única diana o incluso resultados positivos aleatorios (irregulares) sugieren un rendimiento de amplificación ligeramente diferente de las regiones diana. Un resultado negativo para el gen *ORF1ab* y la única amplificación del gen *N* puede ocurrir en muestras con baja carga de este patógeno, debido a diferencias sutiles en la sensibilidad clínica. En caso de un resultado ambiguo, se recomienda solicitar alguna prueba confirmatoria por parte de un laboratorio de referencia si está clínicamente indicado.
- La detección del RNA viral (secuencias de genes *ORF1ab* y/o *N*) puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que el SARS-CoV-2 sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos o la amplificación de una única diana no impiden la infección por el virus SARS-CoV-2 y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras para la identificación de SARS-CoV-2 y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.

- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con SARS-CoV-2, y se han descartado otras enfermedades respiratorias, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2 Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 allows the qualitative detection of SARS-CoV-2 by real-time RT-PCR in respiratory samples (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) and saliva samples. The product is intended for use in SARS-CoV-2 infections diagnosis alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, low profile	7041046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, high profile	7042046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 8 x 8-well strip, low profile	7081046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 8 x 8-well strip, high profile	7082046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 96-well plate, low profile	7091046
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 96-well plate, high profile	7092046

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041046, 7042046, 7081046 and 7082046:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S046/ 7042S046	SARS-CoV-2 strips	-	4/8 x 8-well strip
7C046	SARS-CoV-2 Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4/8 x 8 cap strip

Reagents provided in references 7091046 and 7092046:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P046/ 7092P046	SARS-CoV-2 Plate	-	1 plate
7C046	SARS-CoV-2 Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	12 x 8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- RNA extraction kit
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Coronaviruses are unsegmented single-stranded RNA viruses belonging to family *Coronaviridae* of the order *Nidovirales*. Six kinds of human CoVs have been previously identified: *NL63*, *229E*, *OC43* and *HKU1* which cause upper respiratory tract disease and common cold symptoms and the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) which are highly pathogenic in humans, with high rates of severe pneumonia and fatal outcomes.

In December 2019, a group of pneumonia cases was reported at a wholesale seafood market in Wuhan, Hubei province, which was found to be caused by previously unknown Coronaviruses. Airway epithelial cells from infected patients were used to isolate a novel coronavirus, temporarily named 2019-nCoV. Later, it was found that the new coronavirus is related to the SARS-CoV but is sufficiently divergent from SARS-CoV to be considered a new human-infecting betacoronavirus. Therefore, the International Committee for the classification of viruses designated the name of this coronavirus as the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The World Health Organization has named the disease caused by the SARS-CoV-2 as coronavirus disease 2019 (COVID-19).

People with COVID-19 have had a wide range of symptoms reported, ranging from mild symptoms to severe illness. Symptoms include fever or chills, cough, shortness of breath or difficulty breathing, fatigue, muscle or body aches, headache, loss of taste or smell, sore throat, congestion or runny nose, nausea or vomiting and diarrhea. Symptoms may appear 2-14 days after exposure to the virus. Older people, and those with underlying

medical problems like cardiovascular disease, diabetes, chronic respiratory disease, and cancer are more likely to develop serious illness and infection may progress to pneumonia, acute respiratory distress syndrome and multi-organ failure. The fatality rate ranges from 3% to 4%.

The COVID-19 may be transmitted from person to person through several different routes. The SARS-CoV-2 spreads primarily through droplets of saliva or discharge from the nose when an infected person coughs or sneezes but also by direct contact with an infected subject or indirect contact (through hand-mediated transfer of the virus from contaminated fomites to the mouth, nose, or eyes). Transmission of this virus is occurring from person to person, even during the asymptomatic incubation period.

WHO recommend, for all suspect cases, collection of upper respiratory tract (URT) specimens (nasopharyngeal and oropharyngeal) for testing by RT-PCR and, where clinical suspicion remains and URT specimens are negative, to collect specimens from the lower respiratory tract (LRT) when readily available (expectorated sputum, or endotracheal aspirate/bronchoalveolar lavage in ventilated patient). Additional clinical specimens may be collected as COVID-19 virus has been detected in blood, stool, urine, and saliva.

Diagnostic testing for the SARS-CoV-2 is currently undertaken using chest scan, whole genome sequencing and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR).

Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *ORF1ab* and *N* genes encoded by the SARS-CoV-2. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The SARS-CoV-2 presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity that uses two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolyzed by its 5'-3' exonuclease activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of a real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 is a ready-to used test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the target sequence *ORF1ab* gene is detected through the FAM channel, the amplification of the

target sequence *N* gene is detected through the ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing, and RNA extraction

Patient samples must be collected, transport and storage according to appropriate laboratory guidelines. For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to

use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For respiratory samples, the assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) Kit (Roche).

MagDEA Dx SV kit, using magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).

MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction kit, using MagCore® HF16 automated Nucleic Acid Extractor System.

mSample Preparation Systems RNA, using Abbott m2000 RealTime System (Abbott Molecular).

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

EMAG®Nucleic Acid Extraction System (bioMérieux, Inc).

For saliva samples, the assay has been validated with the following extraction kits:

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, (Promega).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.

- Pipette 5 µL of RNA sample, negative (yellow tube) and positive (red tube) controls and add them to the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription	45°C	15 min	1
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*ORF1ab* gene), ROX (*N* gene) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (attached II).

Analysis and interpretation of results

The results' analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve for SARS-CoV-2 (Ct ≤40) in FAM and ROX channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence for SARS-CoV-2 (Ct ≥40 or no signal) in FAM and ROX channels, which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40 in Positive and Negative Controls wells).

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal' absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

ORF1ab gene (FAM)	N gene (ROX)	Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+	+/-*	Valid	SARS-CoV-2 RNA Detected
+	-	+/-*	Inconclusive	If only one SARS-CoV-2 target gene amplifies, repeat test depending on the available material: a) obtain a new specimen, re-extract, and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample. After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered SARS-CoV-2 positive.
-	+	+/-*	Inconclusive	
-	-	+ [#]	Valid	SARS-CoV-2 RNA Not detected [#]
-	-	- [#]	Invalid	Test failed [#]

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

* Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids.

[#] In the case of negative SARS-CoV-2 target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct less than 40. If there is a signal' absence or Ct value ≥ 40 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR by diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 100 respiratory samples (nasopharyngeal swab) from symptomatic patients with suspicion of COVID-19, were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR SARS-CoV-2 and the results were compared with those obtained using a molecular detection method by the Spanish National Reference Center (ISCIII). SARS-CoV-2 was detected in the 2 positive samples by Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

In another Vitassay qPCR SARS-CoV-2 clinical evaluation, 409 respiratory samples (nasopharyngeal swabs) from patients with suspected COVID-19 disease were analyzed by real-time PCR using Vitassay qPCR SARS-CoV-2 and the results were compared with those previously obtained with the molecular detection method Abbott Real Time SARS-CoV-2 assay (Abbott Molecular). SARS-CoV-2 was detected in 145 positive samples by Vitassay qPCR SARS-CoV-2. Eight discordant samples were obtained but the low amount of template RNA in these respiratory samples is below the detection limit of the method used. These samples were also negative by a test developed according to the 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR panel primers and probes (US CDC protocol).

Besides, the Vitassay qPCR SARS-CoV-2 clinical performance was conducted by testing in parallel 28 anonymized saliva specimens and oropharyngeal swabs from patients with signs and symptoms of COVID-19 infection. The values obtained with the oropharyngeal samples were taken as the reference values. SARS-CoV-2 was detected in 18 saliva samples of the 19 positive samples detected in oropharyngeal smears by Vitassay qPCR SARS-CoV-2. It was demonstrated that the results obtained when analyzing the saliva samples in parallel, were as expected.

These results show high agreement to detect SARS-CoV-2 using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of SARS-CoV-2 template ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of 20 genome copies per reaction for *ORF1ab* and *N* genes with a positive rate of $\geq 95\%$.

Analytical specificity

The analytical specificity for SARS-CoV-2 was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Virginia/ATCC2/2009 (H1N1)pdm09	Human metapneumovirus A, B and 8 Peru6-2003
<i>Candida albicans</i> 3147	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1 and TWAR strain 2023	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS Coronavirus	Influenza A/Wisconsin/15/2009 (H3N2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1LAC
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	Human rhinovirus type C and 17
Enterovirus 68, 71 and D68 US/MO/1418947	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Enterovirus Echovirus 11 and 30	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain RP62A
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	Influenza B/Florida/04/06 virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022 and strain TIGR4
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA and Rd	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	<i>Streptococcus pyogenes</i> typing strain T1
Human Adenovirus types 1-5, 8, 14, 15, 31, 40 and 41	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> strain DSM 13084
Human Bocavirus	<i>Legionella dumoffii</i>	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 was confirmed by real-time amplification using RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 strain hCoV-19/Netherlands/Diemen_1363454/2020 and synthetic RNA controls for two SARS-CoV-2 virus variants: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) and MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- Mic Real Time PCR Cycler bms^I

I: For Rotor-Gene® Q and Mic Real Time PCR Cycler bms. thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of each equipment.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of SARS-CoV-2 infection. All results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with respiratory (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) and saliva samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.

- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either high number of cDNA template copies which contains each SARS-CoV-2 Positive Control vial, samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Vitassay qPCR SARS-CoV-2, designed for the specific SARS-CoV-2 detection, mostly showed no significant combined homologies with the human genome, other coronaviruses, or human microflora that would predict potential false positive RT-qPCR results (except for some N and/or ORF1ab sequences from SARS-CoV, and other coronaviruses identified in bats and pangolin).
- Detection of SARS-CoV-2 may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including RNA isolation); c) RNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the SARS-CoV-2 genome covered by this test which may result in RNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of retrotranscription and/or Real Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs related to COVID-19 was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- The single-gene amplification or even random (irregular) positive results is suggestive of slightly different target regions' amplification yield. A negative result for *ORF1ab* gene and the only amplification of the *N* gene may occur in specimens with low pathogen load, due to subtle differences in clinical sensitivity. In case of an ambiguous result, it is recommended to seek confirmatory testing by a reference laboratory if clinically indicated.
- Detection of viral RNA (*ORF1ab* and/or *N* gene sequences) may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that SARS-CoV-2 is the causative agent for clinical symptoms.
- Negative results or single target amplification do not preclude SARS-CoV-2 virus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Specimens types for the SARS-CoV-2 identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible SARS-CoV-2 infection, and other respiratory illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Bio Molecular Systems	Exicycler™ 96
Mic Real Time PCR Cyclor	Bio-Rad
Cepheid	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
SmartCycler®	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Precision System Science Co., Ltd.	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
geneLEAD VIII System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Qiagen	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Rotor-Gene® Q	Bio Molecular Systems
Roche	Mic Real Time PCR Cyclor
LightCycler®480 Real-Time PCR System	Cepheid
LightCycler®96 Real-Time PCR System	SmartCycler®
Cobas z480 Analyzer	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Precision System Science Co., Ltd.
	geneLEAD VIII System
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

Bibliography/Bibliografía

1. Wang H, Li X, Li T, et al. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 39(9):1629-1635.
2. Ogimi C, Kim YJ, Martin ET, Huh HJ, Chiu CH, Englund JA. (2020). What's New With the Old Coronaviruses? *J Pediatric Infect Dis Soc*. 9(2):210-217.
3. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> Accessed December 2020.
4. World Health Organization. Coronavirus. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1 Accessed September 2020.
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 395(10224):565-574.
6. Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., ... & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*.
7. Liu Z, Chu R, Gong L, Su B, Wu J. (2020). The assessment of transmission efficiency and latent infection period on asymptomatic carriers of SARS-CoV-2 infection [published online ahead of print, 2020 Jun 13]. *Int J Infect Dis*. S1201-9712(20)30471-9.
8. Kumar M, Taki K, Gahlot R, Sharma A, Dhangar K. (2020). A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I - Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci Total Environ*. 734:139278.
9. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*. 66(4):549-555.
10. Lv DF, Ying QM, Weng YS, et al. (2020). Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clin Chim Acta*. 506:172-175.
11. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed December 2020
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Transmission of COVID-19. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/transmission> Accessed December 2020
13. Sharma A, Tiwari S, Deb MK, Marty JL. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *Int J Antimicrob Agents*. 56(2):106054.

14. World Health Organization. Clinical management of COVID-19. Interim guidance 27 May 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed December 2020
15. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed December 2020
16. To KK, Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, et al. (2020) Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin Infect Dis.* 71(15):841-843.
17. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, Huang Z, Li X, Deng K, Lin B, Gao Z. (2020) SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol.* 92(9):1676-1680.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.

Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.










Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

MagDEA® Dx is PSS patented technology (Japanese Patent: No.3115501; US Patent: No.5,702,950; European Patent: No.687501)

EMAG®Nucleic Acid Extraction System is a registered trademark of bioMérieux, Inc.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com