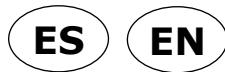


Vitassay qPCR

SARS-CoV-2 Variants

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de RNA de mutaciones genéticas en el gen S (E484K, K417N, K417T y N501Y) en muestras respiratorias positivas de SARS-CoV-2.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of RNA from genetic mutations in the S gene (E484K, K417N, K417T and N501Y) in positive SARS-CoV-2 respiratory samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants permite la detección cualitativa de RNA de mutaciones genéticas en el gen S (E484K, K417N, K417T y N501Y) mediante RT-PCR en tiempo real en muestras nasofaríngeas positivas para SARS-CoV-2. El uso previsto de la prueba es ayudar en la monitorización de la prevalencia de mutaciones genéticas en el gen S (E484K, K417N, K417T y N501Y) y el apoyo de medidas de control.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 4x8-well strip, low profile	7041056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 4x8-well strip, high profile	7042056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 96-well plate, low profile	7091056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 96-well plate, high profile	7092056

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041056 y 7042056:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S056/ 7042S056	SARS-CoV-2 Variants strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C056	SARS-CoV-2 Variants 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 tiras de 8 tapones

Reactivos suministrados para las referencias 7091056 y 7092056:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P056/ 7092P056	SARS-CoV-2 Variants Plate	-	1 placa
7C056	SARS-CoV-2 Variants 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

- Sistema de recolección y transporte.
- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- 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 mediante escáner de tórax, secuenciación del genoma completo y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (rRT-PCR).

En los últimos meses han surgido varias variantes preocupantes del SARS-CoV-2 (VOC) y es fundamental vigilarlas en todos los países. Algunas variantes emergentes del SARS-CoV-2 generan preocupación debido a sus propiedades biológicas alteradas. En diciembre de 2020, el Reino Unido informó una variante preocupante (VOC) del SARS-CoV-2 llamada VOC202012/01 (B.1.1.7) que se encontró asociada con una mayor transmisibilidad. B.1.1.7 se define por múltiples cambios en la proteína *spike* (deleción 69-70, deleción 144, cambio de aminoácidos N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) así como por mutaciones en otras regiones genómicas.

Al mismo tiempo, se anunció que una segunda VOC llamada B.1.351 se difundiría rápidamente en diferentes provincias de Sudáfrica. Esta variante ha generado

preocupación mundial debido a que alberga múltiples mutaciones en la proteína *spike* que potencialmente aumentan la transmisibilidad y producen resistencia a los anticuerpos neutralizantes. B.1.351 contiene dos mutaciones adicionales, K417N y E484K, en el motivo de unión al receptor (RBM) de la región RBD.

Una tercera variante de preocupación denominada P.1 (descendiente de B.1.1.28) se asoció con un mayor número de casos en Manaus, Brasil. El linaje P.1 adquirió 17 mutaciones, incluido un trío en la proteína *spike* (K417T, E484K y N501Y) asociadas con un aumento de la unión al receptor ACE2 humano.

Todas estas variantes incorporan varios reemplazos de aminoácidos en la proteína *spike*, incluidos algunos residuos clave en el sitio de unión al receptor (RBD) u otros sitios. Específicamente, las VOC mencionadas incluyen N501Y en RBD y D614G, mientras que B.1.351 y P.1 también tienen el E484K en la región RBD. B.1.1.7 tiene además dos deleciones en la proteína *spike* que eran únicas en comparación con las otras variantes. Se han descrito variantes adicionales con diferentes combinaciones de mutaciones como el linaje P.2 (descendiente de B.1.1.28) de Brasil que solo alberga la mutación E484K, B.1.1.7 con la adición de E484K o una nueva variante de SARS-CoV-2 dentro del linaje B.1.1.33 que también alberga la mutación E484K y se detectó en Brasil.

Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *S* del SARS-CoV-2 para las mutaciones E484K, K417N, K417T y N501Y. Tras la extracción de RNA, 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 Variants se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Tras la reacción de amplificación la mutación E484K se detecta en el canal FAM, la mutación K417N se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado), la mutación K417T se detecta en el canal ROX y la mutación N501Y se detecta en el canal Cy5.

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.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- 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. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles (libres de RNasa/DNasa) desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo.
- 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. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit utilizando el instrumento KingFisher Flex System (ThermoFisher).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del SARS-CoV-2 Variants 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.

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) o 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:

Etapa	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*)	63°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (E484K), HEX, JOE o VIC (K417N), ROX (K417T) y Cy5 (N501Y). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast 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.

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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 \leq 40) en los canales FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct \geq 40 o no señal) de FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

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:

E484K (FAM)	K417T (ROX)	K417N (HEX)	N501Y (Cy5)	Interpretación	
+	-	-	-	Válido	Mutación E484K detectada
-	+	-	-	Válido	Mutación K417T detectada
-	-	+	-	Válido	Mutación K417N detectada
-	-	-	+	Válido	Mutación N501Y detectada
+	+	-	-	Válido	Mutaciones E484K y K417T detectadas
+	-	+	-	Válido	Mutaciones E484K y K417N detectadas
+	-	-	+	Válido	Mutaciones E484K y N501Y detectadas
-	+	+	-	Válido	Mutaciones K417T y K417N detectadas
-	+	-	+	Válido	Mutaciones K417T y N501Y detectadas
-	-	+	+	Válido	Mutaciones K417N y N501Y detectadas
+	+	+	-	Válido	Mutaciones E484K, K417T y K417N detectadas
+	-	+	+	Válido	Mutaciones E484K, K417N y N501Y detectadas
-	+	+	+	Válido	Mutaciones K417T, K417N y N501Y detectadas
+	+	+	+	Válido	Mutaciones E484K, K417T, K417N y N501Y detectadas
-	-	-	-	Válido	Mutaciones E484K, K417T, K417N y N501Y no detectadas

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct ≥40 o no señal)

La presencia de la mutación E484K en el gen S se detectó por primera vez en los siguientes linajes: B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.351, la presencia de la mutación K417T en el gen S en el linaje B.1.1.28, la presencia de la mutación K417N en el gen S en el linaje B.1.351 y la presencia de la mutación N501Y en el gen S en los siguientes linajes: B.1.1.28, B.1.1.7, B.1.351.

(<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> Consultado Mayo 21).

Otras variantes pueden presentar las mutaciones K417T, K417N, E484K o N501Y debido a que no son específicas de las variantes mencionadas.

La asignación final a un linaje debe realizarse mediante secuenciación.

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. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada).

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

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

La sensibilidad y la especificidad clínica de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants se evaluó utilizando muestras clínicas respiratorias (muestras nasofaríngeas recogidas en UTM) ya caracterizadas como SARS-CoV-2 positivas y secuenciadas para asignar linaje (WGS).

En los estudios realizados en colaboración con el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) y el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón se analizaron un total de 159 muestras positivas para SARS-CoV-2 y en colaboración con el Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Basurto y el Biobanco Vasco se analizaron un total de 62 muestras positivas para SARS-CoV-2. En ambos estudios la

extracción se realizó con el kit MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation kit utilizando el KingFisher™ Flex system (Thermo-Fisher SCIENTIFIC), y el termociclador utilizado fue el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad).

En ambos estudios los resultados obtenidos con Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants se compararon con los valores obtenidos por WGS. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

IACS - Biobanco del Sistema de Salud de Aragón									
Diana	TP	TN	FP	FN	Overall agreement	SE	SP	PPV	NPV
mutación N501Y	126	28	0	5	0.96 (0.92-0.98)	0.96 (0.91-0.98)	1 (0.87-1)	0.96 (0.91-0.98)	1 (0.87-1)
mutación E484K	14	145	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)	1 (0.78-1)	1 (0.97-1)
mutación K417N	3	156	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.29-1)	1 (0.97-1)	1 (0.43-1)	1 (0.97-1)
mutación K417T	0	159	0	0	1 (0.97-1)	NA*	1 (0.97-1)	NA*	1 (0.97-1)

TP = Verdaderos positivos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor predictivo positivo, NPV = Valor predictivo negativo. * Debido a que las muestras analizadas fueron negativas para la mutación K417T, no pudo calcularse la sensibilidad analítica de la prueba.

Hospital Universitario Basurto - Biobanco Vasco									
Diana	TP	TN	FP	FN	Overall agreement	SE	SP	PPV	NPV
mutación N501Y	53	9	0	0	1 (0.94-1)	0.91 (0.81-0.97)	1 (0.66-1)	1 (0.93-1)	1 (0.70-1)
mutación E484K	60	2	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.94-1)	1 (0.15-1)	1 (0.94-1)	1 (0.34-1)
mutación K417N	3	59	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.29-1)	1 (0.93-1)	1 (0.43-1)	1 (0.93-1)
mutación K417T	47	12	0	3	0.95 (0.86-0.98)	0.94 (0.83-0.98)	1 (0.73-1)	0.94 (0.83-0.97)	1 (0.75-1)

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar las mutaciones N501Y, E484K, K417N y K417T en muestras previamente caracterizadas como positivas para SARS-CoV-2 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de las mutaciones N501Y, E484K, K417N y K417T (10^7 - 10^1 copias/reacción).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants tiene un límite de detección (LoD) de 40 copias genómicas/rxn para N501Y calculado utilizando RNA procedente del linaje SARS-CoV-2 B.1.1.7 y 80 copias genómicas/rxn para N501Y medido utilizando RNA del linaje SARS-CoV-2 B.1.351.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants tiene un límite de detección (LoD) de 40 copias genómicas/rxn para E484K calculado utilizando RNA de los linajes SARS-CoV-2 B.1.351 y B.1.1.28.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants tiene un límite de detección (LoD) de 40 copias genómicas/rxn para K417N calculado utilizando RNA del linaje SARS-CoV-2 B.1.351.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants tiene un límite de detección (LoD) de 80 copias genómicas/rxn para K417T calculado utilizando RNA del linaje SARS-CoV-2 B.1.1.28.

Especificidad analítica

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

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

<i>Pneumocytis jirovecii</i> Tipo A1 y g885652	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	Parainfluenza virus humano 1, 2, 3 y 4
Virus respiratorio sincitial (RSV) A y B	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	Bocavirus humano
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A y C	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza B/Florida/04/06 virus	Rhinovirus humano tipo C
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	SARS Coronavirus Cepa Frankfurt 1
MERS Coronavirus	<i>Legionella bozemanii</i>	2019-nCoV humano cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 *
Enterovirus 68 y 71	<i>Legionella dumoffii</i>	2019-nCoV humano cepa 2019-nCoV/Italy-INM1 *
Enterovirus Echovirus 30	<i>Legionella longbeachae</i>	SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USA-WA1/2020 *
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	<i>Legionella micdadei</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Legionella pneumophila</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Metapneumovirus humano A y B	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER*
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) *
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1) *
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina	

* Debe tener en cuenta que la detección de estas cepas de SARS-CoV-2 no se considera en este ensayo. Esta prueba está diseñada para la detección cualitativa de RNA de mutaciones genéticas específicas en el gen S (E484K, K417N, K417T y N501Y) presente en varias variantes del SARS-CoV-2.

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants para la mutación E484K se evaluó frente a RNA extraído a partir de B.1.351 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16) y B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants para la mutación K417N se evaluó frente a RNA extraído a partir de B.1.351(Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants para la mutación K417T se evaluó frente a RNA extraído a partir de B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants para la mutación N501Y se evaluó frente a RNA extraído a partir de B.1.1.7_710528 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14), B.1.1.7_601443 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15), B.1.351(Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16) y B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96 [™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- LightCycler 480 Instrument (Roche)
- Linear NEOS-96 Real Time PCR System

I: 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

- La prueba es para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- Este ensayo ha sido probado en muestras respiratorias (hisopo nasofaríngeo). 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- 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 resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con RNA procedente de mutaciones genéticas de SARS-CoV-2, ya sea por el gran número de copias de cDNA molde que contiene cada vial SARS-CoV-2 Variants 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.
- La detección 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. En caso de duda, consulte la sección Análisis e interpretación de resultados para comprobar la interpretación correcta de los resultados.
- La detección del RNA viral 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.
- La presencia de la mutación E484K en el gen S se detectó por primera vez en los siguientes linajes: B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.351, la presencia de la mutación K417T en el gen S en el linaje B.1.1.28, la presencia de la mutación K417N en el gen S en el linaje B.1.351 y la presencia de la mutación N501Y en el gen S

en los siguientes linajes: B.1.1.28, B.1.1.7, B.1.351, sin embargo, la asignación final a un linaje debe realizarse mediante secuenciación.

- Resultados negativos no excluyen la presencia de SARS-CoV-2 debido a que este ensayo está diseñado para su uso en muestras positivas a SARS-CoV-2.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.

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 Cyler
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 Cyler
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
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	250
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	500
	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 Variants allows the qualitative detection of RNA from genetic mutations in the S gene (E484K, K417N, K417T and N501Y) by real-time RT-PCR in positive SARS-CoV-2 nasopharyngeal samples. The test is intended for use in the monitoring of the prevalence of genetic mutations in the S gene (E484K, K417N, K417T, and N501Y) and to support control measures.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 4x8-well strip, low profile	7041056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 4x8-well strip, high profile	7042056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 96-well plate, low profile	7091056
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants 96-well plate, high profile	7092056

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041056 and 7042056:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S056/ 7042S056	SARS-CoV-2 Variants strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C056	SARS-CoV-2 Variants 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 x 8-cap strip

Reagents provided in references 7091056 and 7092056:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P056/ 7092P056	SARS-CoV-2 Variants Plate	-	1 plate
7C056	SARS-CoV-2 Variants 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

- Collection and transport system.
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- 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 undertaken using chest scan, whole genome sequencing and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR).

Several SARS-CoV-2 variants of concern (VOC) have emerged in the past months and monitoring them in all countries is key. Some emergent SARS-CoV-2 variants raise concerns due to their altered biological properties. On December 2020, the United Kingdom reported a SARS-CoV-2 variant of concern (VOC) called VOC202012/01 (B.1.1.7) which was found associated with increased transmissibility. B.1.1.7 is defined by multiple spike protein changes (deletion 69-70, deletion 144, amino acid change N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) as well as by mutations in other genomic regions.

At the same time, a second VOC named B.1.351 was announced to rapidly spread in different provinces of South Africa. This variant has been raising global concern due to its harboring of multiple mutations in the spike that potentially increase transmissibility and yield resistance to neutralizing antibodies. B.1.351 contains additional two mutations, K417N and E484K, in receptor binding motif (RBM) of the RBD region.

A third variant of concern named P.1 (B.1.1.28 descendent) was associated with an increased number of cases in Manaus, Brazil. Lineage P.1 acquired 17 mutations including a trio in the spike protein (K417T, E484K and N501Y) associated with increased binding to the human ACE2 receptor.

All these variants embed several amino acid replacements in the spike including some key residues in the receptor binding site (RBD) or other sites. Specifically, the mentioned VOC include N501Y in RBD and D614G, while B.1.351 and P.1 have also the E484K in RBD region. B.1.1.7 has additionally two deletions in spike that were unique compared to the other variants. Additional variants with different combinations of mutations have been described such as lineage P.2 (B.1.1.28 descendent) from Brazil that only harbors mutation E484K, the B.1.1.7 with the addition of E484K or a new SARS-CoV-2 variant within lineage B.1.1.33 that also harbors mutation E484K and was detected in Brazil.

Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants is based on the real-time amplification of an S gene conserved region of SARS-CoV-2 for E484K, K417N, K417T and N501Y. After RNA extraction, the SARS-CoV-2 presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. After the amplification reaction, the E484K mutation is detected in the FAM channel, the K417N mutation is detected in the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2), the K417T mutation is detected in the ROX channel and the N501Y mutation is detected on channel Cy5.

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.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the test functionality.
- 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. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended.
- 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. Follow the manufacturer's instructions for use. The assay has been validated with the following extraction kits:

- MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 Variants Positive Control (red tube) with 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 it is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

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) or positive (red tube) controls and add them into 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*)	63°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the channels FAM (E484K), HEX, JOE o VIC (K417N), ROX (K417T) and Cy5 (N501Y). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast 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.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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 ($C_t \leq 40$) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($C_t \geq 40$ or no signal) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

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:

E484K (FAM)	K417T (ROX)	K417N (HEX)	N501Y (Cy5)	Interpretation	
+	-	-	-	Valid	E484K mutation detected
-	+	-	-	Valid	K417T mutation detected
-	-	+	-	Valid	K417N mutation detected
-	-	-	+	Valid	N501Y mutation detected
+	+	-	-	Valid	E484K and K417T mutations detected
+	-	+	-	Valid	E484K and K417N mutations detected
+	-	-	+	Valid	E484K and N501Y mutations detected
-	+	+	-	Valid	K417T and K417N mutations detected
-	+	-	+	Valid	K417T and N501Y mutations detected
-	-	+	+	Valid	K417N and N501Y mutations detected
+	+	+	-	Valid	E484K, K417T and K417N mutations detected
+	-	+	+	Valid	E484K, K417N and N501Y mutations detected
-	+	+	+	Valid	K417T, K417N and N501Y mutations detected
+	+	+	+	Valid	E484K, K417T, K417N and N501Y mutations detected
-	-	-	-	Valid	E484K, K417T, K417N and N501Y mutations not detected

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct ≥40 or no signal)

The presence of the E484K mutation in the S gene has been first detected in the following lineages: B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.351, the presence of the K417T mutation in the S gene in the lineage B.1.1.28, the presence of the K417N mutation in the S gene in the lineage B.1.351 and the presence of the N501Y mutation in the S gene in the following lineages: B.1.1.28, B.1.1.7, B.1.351.

(<https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-variants-genomically-confirmed-case-numbers/variants-distribution-of-cases-data> Accessed May 21).

Other variants can present the mutations K417T, K417N, E484K or N501Y because they are not specific for the mentioned variants.

The final assignment to a lineage must be done by sequencing.

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. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

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

A positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants was evaluated using respiratory clinical samples (nasopharyngeal samples collected in UTM) already characterized as SARS-CoV-2 positive and sequenced to assign lineage (WGS).

In the studies carried out in collaboration with the Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) and the Aragon Health System Biobank, a total of 159 samples positive for SARS-CoV-2 were analysed and in collaboration with the Clinical Microbiology Service from the Hospital Universitario Basurto and the Basque Biobank, a total of 62 samples positive for SARS-CoV-2 were analysed. In both studies, extraction was performed with the MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation kit using the

KingFisher™ Flex system (Thermo-Fisher SCIENTIFIC), and the thermal cycler used was the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad).

In both studies the results obtained with Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants were compared with the values obtained by WGS. The obtained results are shown in the following tables:

IACS - Aragon Health System Biobank									
Target	TP	TN	FP	FN	Overall agreement	SE	SP	PPV	NPV
N501Y mutation	126	28	0	5	0.96 (0.92-0.98)	0.96 (0.91-0.98)	1 (0.87-1)	0.96 (0.91-0.98)	1 (0.87-1)
E484K mutation	14	145	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.76-1)	1 (0.97-1)	1 (0.78-1)	1 (0.97-1)
K417N mutation	3	156	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.29-1)	1 (0.97-1)	1 (0.43-1)	1 (0.97-1)
K417T mutation	0	159	0	0	1 (0.97-1)	NA*	1 (0.97-1)	NA*	1 (0.97-1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value. * Due to analyzed samples were negative for K417T mutation, the analytical sensitivity of the test could not be performed.

Hospital Universitario Basurto - Basque Biobank									
Target	TP	TN	FP	FN	Overall agreement	SE	SP	PPV	NPV
N501Y mutation	53	9	0	0	1 (0.94-1)	0.91 (0.81-0.97)	1 (0.66-1)	1 (0.93-1)	1 (0.70-1)
E484K mutation	60	2	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.94-1)	1 (0.15-1)	1 (0.94-1)	1 (0.34-1)
K417N mutation	3	59	0	0	1 (0.94-1)	1 (0.29-1)	1 (0.93-1)	1 (0.43-1)	1 (0.93-1)
K417T mutation	47	12	0	3	0.95 (0.86-0.98)	0.94 (0.83-0.98)	1 (0.73-1)	0.94 (0.83-0.97)	1 (0.75-1)

These results show high agreement to detect N501Y, E484K, K417N and K417T mutations in samples previously characterized as SARS-CoV-2 positive using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of N501Y, E484K, K417N and K417T mutations standards ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants has a detection limit (LoD) of 40 genome copies/rxn for N501Y measured using RNA from SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage and 80 genome copies/rxn for N501Y measured with RNA from SARS-CoV-2 B.1.351 lineage.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants has a detection limit (LoD) of 40 genome copies/rxn for E484K measured using RNA from SARS-CoV-2 B.1.351 lineage and SARS-CoV-2 B.1.1.28 lineage.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants has a detection limit (LoD) of 40 genome copies/rxn for K417N measured using RNA from SARS-CoV-2 B.1.351 lineage.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants has a detection limit (LoD) of 80 genome copies/rxn for K417T measured using RNA from SARS-CoV-2 B.1.1.28 lineage.

Analytical specificity

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

Cross-reactivity assay		
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	Human Bocavirus
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Chlamydomydia pneumoniae</i> CM-1	Influenza B/Florida/04/06 virus	Human rhinovirus type C
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
MERS Coronavirus	<i>Legionella bozemanii</i>	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 *
Enterovirus 68 and 71	<i>Legionella dumoffii</i>	Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INM1 *
Enterovirus Echovirus 30	<i>Legionella longbeachae</i>	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020 *
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	<i>Legionella micdadei</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER*
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Legionella pneumophila</i>	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/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) *
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1) *
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	

* 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 RNA from specific genetic mutations in the S gene (E484K, K417N, K417T and N501Y) present in several SARS-CoV-2 variants.

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants for E484K mutation was evaluated against RNA from B.1.351(Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16) and B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants for K417N mutation was evaluated against RNA from B.1.351(Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16), showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants for K417T mutation was evaluated against RNA from B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), showing positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants for N501Y mutation was evaluated against RNA from B.1.1.7_710528 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14), B.1.1.7_601443 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15), B.1.351(Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 16) and B.1.1.28 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17), showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- 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)
- LightCycler 480 Instrument (Roche)
- Linear NEOS-96 Real Time PCR System

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

Limitations

- The test is for professional *in vitro* diagnostic use.
- This assay was tried with respiratory samples (nasopharyngeal swabs). 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.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 positives results due to cross-contamination by SARS-CoV-2 RNA from genetic mutations, either by high number of cDNA template copies which contains each SARS-CoV-2 Variants Positive Control vial, samples containing high concentrations of target template RNA or by carryover contamination from PCR products from previous reactions.
- Detection 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. If in doubt, refer to section Analysis and interpretation of results to check the correct interpretation of the results.
- Detection of viral RNA may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that SARS-CoV-2 is the causative agent for clinical symptoms.
- The presence of the E484K mutation in the *S* gene has been first detected in the following lineages: B.1.1.28, B.1.1.33, B.1.351, the presence of the K417T mutation in the *S* gene in the lineage B.1.1.28, the presence of the K417N mutation in the *S* gene in the lineage B.1.351 and the presence of the N501Y mutation in the *S* gene in the following lineages: B.1.1.28, B.1.1.7, B.1.351, however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 presence due to this assay is intended to use with positive SARS-CoV-2 samples.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.

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
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

High profile Block Thermocyclers
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™ 2Real-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

* 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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	250
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	500
	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 March 2021.
4. World Health Organization. Coronavirus. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1 Accessed March 2021.
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 March 2021
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 March 2021
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 March 2021
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 March 2021
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.
18. 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 March 2021.
19. Du Z, Wang L, Yang B, Ali ST, Tsang TK, Shan S, Wu P, Lau EHY, Cowling BJ, Meyers LA. (2021) International risk of the new variant COVID-19 importations originating in the United Kingdom. medRxiv [Preprint]. Jan 15:2021.01.09.21249384.
20. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. (2020) Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Virological.org. Available from: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563> Accessed March 2021
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. March 2021. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-identification-sars-cov-2-variants> Accessed March 2021
22. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 - increased circulation of variants of concern and vaccine rollout in the EU/EEA, 14th update. 15 February 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-risk-assessment-variants-vaccine-fourteenth-update-february-2021> Accessed March 2021
23. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, et al. (2021) Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 70:95–99

24. Kostaki EG, Tseti I, Tsiodras S, Pavlakis GN, Sfikakis PP, Paraskevis D. (2021) Temporal Dominance of B.1.1.7 over B.1.354 SARS-CoV-2 Variant: A Hypothesis Based on Areas of Variant Co-Circulation. *Life (Basel)*. Apr 22;11(5):375.
25. Faria NR, et al. (2021) Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. Apr 14:eabh2644.
26. Kim YJ, Jang US, Soh SM, Lee JY, Lee HR. (2021) The Impact on Infectivity and Neutralization Efficiency of SARS-CoV-2 Lineage B.1.351 Pseudovirus. *Viruses*. Apr 7;13(4):633.
27. Resende PC, et al. (2021) A Potential SARS-CoV-2 Variant of Interest (VOI) Harboring Mutation E484K in the Spike Protein Was Identified within Lineage B.1.1.33 Circulating in Brazil. *Viruses*. Apr 21;13(5):724.
28. Singh J, Samal J, Kumar V, Sharma J, Agrawal U, Ehtesham NZ, Sundar D, Rahman SA, Hira S, Hasnain SE. (2021) Structure-Function Analyses of New SARS-CoV-2 Variants B.1.1.7, B.1.351 and B.1.1.28.1: Clinical, Diagnostic, Therapeutic and Public Health Implications. *Viruses*. Mar 9;13(3):439.
29. 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 May 2021.
30. 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 May 2021.
31. 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 May 2021.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

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

	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