

Vitassay qPCR

SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N)

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de RNA de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias.

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



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) permite la detección cualitativa de RNA de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real en muestras respiratorias. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por el virus SARS-CoV-2, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológico, y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 4x8-well strip, low profile	7041060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 4x8-well strip, high profile	7042060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 96-well plate, low profile	7091060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 96-well plate, high profile	7092060

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041060 y 7042060:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S060/ 7042S060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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 7091060 y 7092060:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P060/ 7092P060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) Plate low/high profile	-	1 placa
7C060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- 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 (RT-PCR).

Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de los genes *ORF1ab*, *E* and *N* del SARS-CoV-2. 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 hidrolisis 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 (ORF1ab, E & N) 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. Además, un control interno endógeno permite el control del proceso de extracción y la detección de una posible reacción de inhibición. El ensayo utiliza un gen humano housekeeping como control interno endógeno (CI) (gen *RNase P* presente en el DNA humano) que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas. La amplificación de la secuencia diana del gen *ORF1ab* es detectada en el canal FAM, la amplificación de la secuencia diana del gen *E* es detectada en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado), la amplificación de la secuencia diana del gen *N* es detectada en el canal Cy5 mientras que el control interno endógeno (CI) se detecta en el canal ROX.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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.
- 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. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- 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.

- 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

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR SARS-COV-2 (ORF1ab, E & N) ha sido testado en muestras nasofaríngeas obtenidas con hisopos de fibra sintética con plástico e inmediatamente introducido en viales estériles con medio de transporte viral (Viral Transport Media, Vircell®), medio de transporte viral universal BD™, medio de transporte universal, y medio de preservación (Biocomma®). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), y ser procesadas a la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Los especímenes pueden ser transportados entre 2-8°C hasta 72 horas, y para transportes de duración mayor de 72 horas, se recomienda realizar el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 72 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información, puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b.
- Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.
- Specimen collection guidelines. (CDC). Disponible en: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>
- Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes sistemas de extracción han sido validados:

MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit utilizando el equipo KingFisher Flex System (ThermoFisher).

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

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

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*ORF1ab* gen), HEX, JOE o VIC (*E* gen), Cy5 (*N* gen) y ROX (Control interno endógeno (CI)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (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 y el procedimiento de extracción compruebe la emisión de señal de control interno endógeno (CI).

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 debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación ($C_t \leq 40$) 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 >40 o no señal) de FAM, Cy5, ROX y HEX, VIC o JOE.

El control positivo incluye la diana del gen *housekeeping RNase P* presente en el DNA humano, por lo tanto, se observan señales de amplificación en todos los canales, incluido el control interno endógeno.

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:

ORF1ab gen (FAM)	E gen (HEX)	N gen (Cy5)	Control interno endógeno (ROX)	Interpretación	
+	+	+	+/-*	Válido	RNA de SARS-CoV-2 detectado. Si uno de los genes no está amplificado, puede deberse a: Baja concentración del gen diana por debajo del límite de detección, mutaciones genéticas en la región diana específica u otros factores.
+	+	-	+/-*	Válido	
+	-	+	+/-*	Válido	
-	+	+	+/-*	Válido	
+	-	-	+/-*	Inconcluso	Si únicamente amplifica un gen diana de SARS-CoV-2, repita el test dependiendo del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente), b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o, c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada. Después de repetir la prueba una vez, si al menos un gen diana resulta positivo, la muestra debe considerarse positiva para SARS-CoV-2.
-	-	+	+/-*	Inconcluso	
-	+	-	+/-*	Inconcluso	RNA de Sarbecovirus detectado. RNA específico de SARS-CoV-2 no detectado. Repita la prueba. Si se obtiene el mismo resultado, se requiere confirmación adicional para diferenciar entre SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 y otros Sarbecovirus cuya infección en humanos se desconoce.
-	-	-	+ [#]	Válido	RNA de SARS-CoV-2 no Detectado [#]
-	-	-	- [#]	Inválido	Test fallido [#]

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

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

* En ocasiones, la detección del control interno endógeno 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. El control interno endógeno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

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 ≤35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el Control interno endógeno es un gen humano *housekeeping* que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "invalido" 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. 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

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno endógeno (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

Para la evaluación del funcionamiento del kit Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) con muestras clínicas se emplearon un total de 1003 remanentes de muestras nasofaríngeas de pacientes con síntomas clínicos y/o sospecha por infección de SARS-CoV-2, y previamente caracterizadas por métodos moleculares y/o secuenciación en el caso de las positivas para SARS-CoV-2. Tras la toma de muestra con el hisopo, ésta fue recolectada en medio de transporte y analizada por el método rutinario con diferentes ensayos moleculares (Panther Fusion SARS-CoV-2 assay (Hologic®), Simplexa™

COVID-19 Direct Kit (DiaSorin Molecular), Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene) y Cobas® SARS-CoV-2 Real Time RT-PCR test (Roche)) y secuenciación para su diagnóstico inicial. El remanente fue congelado a -20°C hasta su posterior análisis con el kit de Vitassay. La extracción se realizó con MagMAX™ Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation Kit utilizando el KingFisher Flex System (ThermoFisher) y el termociclador utilizado fue el CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

La caracterización inicial mostró 556 muestras negativas y 447 positivas para SARS-CoV-2, entre las cuales había diferentes variantes, incluyendo 14 muestras de la cepa inicial de Wuhan y diferentes linajes de las variantes que surgieron más adelante.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) detectó 465 positivos y 538 muestras negativas, de las cuales 24 fueron resultados discrepantes: 21 falsos positivos y 3 falsos negativos. Tras esta comparación, se calcularon los valores de sensibilidad y especificidad con intervalo de confianza del 95%, donde la sensibilidad fue de 0.99 (0.98-0.99), y la especificidad de 0.96 (0.94-0.97).

En conclusión, Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) presenta una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de SARS-CoV-2, cuando es comparado con la secuenciación de muestras.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 0.625 copias genómicas por reacción para el gen *ORF1ab*, ≥ 1.25 copias genómicas por reacción para el gen *E* y ≥ 1.25 copias genómicas por reacción para el gen *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:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C	-	Virus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	-	Parainfluenza virus humano 1, 2, 3 y 4	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> CM-1	-	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8)	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Tipo A1 y g885652	-
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	-	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	Rhinovirus humano tipo C y 17	-
MERS-CoV cepa Florida/USA-2_Saudi Arabia_2014	-	Virus Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Adenovirus humano tipos 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	Metapneumovirus humano A y B	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Virus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Virus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> TMC 331	-
SARS Coronavirus cepa Frankfurt 1	-	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 y 71	-	Virus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B	-
Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) cepa Long	-

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) se evaluó frente a las siguientes cepas: Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1; Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1; Human 2019-nCoV strain 2019nCoV/USA-WA1/2020; SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin /ChVir1670/2020_IsolatBER, SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984 /2020; SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1 /ChVir1577/2020_IsolatBER y controles de ARN sintético para siete variantes del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020); MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1); 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); P.1 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17) y B.1.617.1 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 18), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

^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).

^{II}: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

Limitaciones

- 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 validado con RNA extraído de muestras nasofaríngeas. 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 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, ya sea por el SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) positivo control durante su reconstitución, por 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 la extracción de RNA); c) Degradación del RNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la retrotranscripción o de la 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 utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma);f) Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de SARS-CoV-2; 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 correcta interpretación 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.
- Resultados negativos 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 óptimos 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.

- Algunas muestras pueden no presentar curvas de amplificación de *RNasa P* debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original. Una señal del CI endógeno negativa no impide la presencia de RNA de SARS-CoV-2 en una muestra clínica.
- 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
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
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™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

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 (ORF1ab, E & N) allows the qualitative detection of SARS-CoV-2 RNA by real-time RT-PCR in respiratory samples. This product is intended to aid in the diagnosis of infections caused by SARS-CoV-2 virus, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 4x8-well strip, low profile	7041060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 4x8-well strip, high profile	7042060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 96-well plate, low profile	7091060
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 96-well plate, high profile	7092060

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041060 and 7042060:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S060/ 7042S060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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 7091060 and 7092060:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P060/ 7092P060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) Plate low/high profile	-	1 plate
7C060	SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- 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 undertaken using chest scan, whole genome sequencing and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) is based on the real-time amplification of a conserved region of SARS-CoV-2 *ORF1ab*, *E* and *N* genes. 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 hydrolysed 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 (ORF1ab, E & N) is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an endogenous internal control allows the extraction process control and the detection of a possible inhibition reaction. The assay uses a human housekeeping gene

as an endogenous internal control (IC) (*RNase P* gene present in human DNA) that is expected to be present in all nucleated human cells. The amplification of the target sequence *ORF1ab* gene is detected through the FAM channel, the amplification of the target sequence *E* gene is detected through the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used), the amplification of the target sequence *N* gene is detected through the Cy5 channel whereas the endogenous internal control (IC) in ROX channel.

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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.
- 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. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- 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 color different from whitish) does not alter the test functionality.
- 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

For specimen collection, conservation and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) has been tested on nasopharyngeal samples collected with synthetic fiber swabs with plastic and deposited immediately into a sterile transport tube in different transport media as Viral Transport Media (Vircell®), BD™ universal viral transport medium, Universal Transport Medium and preservation medium (Biocomma®). Other sample types should be validated by the user.

Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and be processed as soon as possible to guarantee the test quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at 2°C to 8°C for up to 72 hours and for long term transport (more than 72 hours), it is recommended shipping at -20°C or lower. The samples can be stored at 2°C to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation during a long time. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b.
- Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.
- Specimen collection guidelines. (CDC). Available at: <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>
- Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The following extraction kits have been validated:

MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System (ThermoFisher).

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

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

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) 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*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the channels FAM (*ORF1ab* gen), HEX, JOE, or VIC (*E* gen), Cy5 (*N* gen) and ROX (Endogenous Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (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, and the extraction procedure, check the endogenous internal control (IC) signal emission.

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 ($C_t > 40$ or no signal) in FAM, Cy5, ROX and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

The positive control includes the human *housekeeping RNase P* gene target; therefore, amplification signals are observed in all target channels, including the Endogenous Internal Control.

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 gen (FAM)	E gen (HEX)	N gen (Cy5)	Endogenous Internal Control (ROX)	Interpretation	
+	+	+	+/-*	Valid	SARS-CoV-2 RNA Detected. If one of the genes is not amplified, this may be due to: Low concentration of the target gene below the detection limit, genetic mutations in the specific target region or other factors.
+	+	-	+/-*	Valid	
+	-	+	+/-*	Valid	
-	+	+	+/-*	Valid	
+	-	-	+/-*	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	
-	+	-	+/-*	Inconclusive	
-	-	-	+ [#]	Valid	Sarbecovirus RNA is detected but no specific SARS-CoV-2 RNA is detected. Repeat the test. In case of obtaining the same result, additional confirmation is required to differentiate between SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and other Sarbecoviruses whose infection in humans is unknown.
-	-	-	- [#]	Invalid	Failed test [#]

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

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

* Sometimes, the Endogenous 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. The Endogenous Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

In the case of negative SARS-CoV-2 target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control is a human *housekeeping* gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is a signal' absence or Ct value > 35 of Endogenous 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. 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

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Endogenous 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

For the Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) kit's clinical performance evaluation, a total of 1003 remnants of nasopharyngeal samples from patients with clinical manifestations and/or suspected SARS-CoV-2 infection, previously characterised by molecular methods and/or sequencing in the case of those positive for SARS-CoV-2, were used. After swab collection, the sample was inoculated in transport media and analysed by routine method with different molecular assays (Panther Fusion SARS-CoV-2 assay (Hologic®), Simplexa™ COVID-19 Direct Kit (DiaSorin Molecular), Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene) and Cobas® SARS-CoV-2 Real Time RT-PCR test (Roche)) and sequencing for initial diagnosis. The remnant was frozen at -20°C until further analysis with the Vitassay kit. Extraction was performed with the MagMAX™ Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System

(ThermoFisher) and the thermocycler used was the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Initial characterisation showed 556 negative and 447 positive samples for SARS-CoV-2, among which there were different variants, including 14 samples of the initial Wuhan strain and different lineages of variants later emerged.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) detected 465 positive and 538 negative samples, of which 24 were discrepant results: 21 false positives and 3 false negatives. After this comparison, sensitivity, and specificity values with 95% confidence interval were calculated, where sensitivity was 0.99 (0.98-0.99), and specificity 0.96 (0.94-0.97).

In conclusion, Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) has a high sensitivity and specificity for the SARS-CoV-2 detection, when compared to sequenced samples.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) has a detection limit of ≥ 0.625 genome copies per reaction for *ORF1ab* gene, ≥ 1.25 genome copies per reaction for *E* gene and ≥ 1.25 genome copies per reaction for *N* gene with a positive rate of 95%.

Analytical specificity

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

Cross-reactivity testing					
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	Human Parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/2016 (H5N8) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human Coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	Human Rhinovirus type C and 17	-
MERS-CoV strain Florida/USA-2_Saudi Arabia_2014	-	Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human Metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> TMC 331	-
SARS Coronavirus strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	-
Enterovirus Echovirus 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) strain Long	-

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) kit's reactivity for SARS-CoV-2 was evaluated against the following strains: Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1; Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1; Human 2019-nCoV strain 2019nCoV/USA-WA1/2020; SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER, SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020; SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER and synthetic RNA controls for seven SARS-CoV-2 virus variants: MT007544.1 (SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020); MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1); 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); P.1 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 17) and B.1.617.1 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 18), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

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

^{II}: For Rotor-Gene® Q thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q tubes.

Limitations

- All obtained results should be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with RNA extracted from nasopharyngeal samples. The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; RNA must be properly extracted from clinical samples.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This test is a qualitative assay.
- A low copy number of the target template may be detected below the limit of detection, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by SARS-CoV-2 (ORF1ab, E & N) positive control during reconstitution, by samples containing high concentrations of target template, or by PCR products of 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) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) 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 used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) Mutations or polymorphisms in primer or probes binding regions that may affect the detection of new or unknown SARS-CoV-2 variants; 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.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 virus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types 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.

- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative endogenous IC signal does not preclude the SARS-CoV-2 RNA presence in a clinical specimen.
- 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	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) 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	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	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	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquaring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	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/Bibliography










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

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

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
			Número de referencia Catalogue number



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

www.vitassay.com