

Vitassay qPCR

SARS-CoV-2

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

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



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 permite la detección cualitativa del 2019 Nuevo Coronavirus (SARS-CoV-2) mediante RT-PCR en tiempo real en muestras respiratorias. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por SARS-CoV-2.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, low profile 7041046

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, high profile 7042046

Materiales/Reactivos suministrados

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

Condiciones de Transporte y conservación.

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

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

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

Resumen

En diciembre de 2019 en Wuhan (Hubei, China) ciertas personas que vivían o trabajaban cerca de un mercado de mariscos presentaron neumonía de causa desconocida. La secuenciación de las muestras respiratorias determinó la presencia de un nuevo tipo de coronavirus, 2019 nuevo coronavirus (2019-nCoV).

Los coronavirus son virus envueltos de RNA de cadena positiva no segmentados que pertenecen a la familia *Coronaviridae*. Se conocen seis especies de coronavirus que causan enfermedades humanas: 229E, OC43, NL63, HKU1, SARS-CoV, y, MERS-CoV. Los cuatro primeros causan síntomas de resfriado común, mientras que los dos últimos son zoonóticos y producen complicaciones más severas.

La transmisión de este virus se está dando de persona a persona, incluso durante el periodo de incubación en asintomáticos. El 2019-nCoV causa enfermedad respiratoria severa como la que produce el SARS-CoV. La neumonía es la principal enfermedad asociada, aunque algunos pacientes han desarrollado edema pulmonar, neumonía severa, síndrome de dificultad respiratoria aguda o fallo multiorgánico y muerte. También provoca síntomas menos comunes como dolor de cabeza, dolor de garganta, diarrea y vómitos. Los síntomas del 2019-nCoV pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 días después de la exposición, siendo los más comunes tos, fiebre, disnea y mialgia.

Las muestras recomendadas por la WHO para la identificación del 2019-nCoV son las procedentes de las vías respiratorias inferiores (esputos, lavados broncoalveolares o aspirados endotraqueales). Si no fueran posible se tomarán muestras del tracto respiratorio superior, sangre, orina y heces.

El diagnóstico del 2019-nCoV se realiza detectando las causas convencionales de la neumonía temprana y por secuenciación masiva o métodos de RT-PCR a tiempo real.

Principio del test

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

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

la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

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

Precauciones

- Diseñado para uso en investigación.
- 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.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- 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

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:

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

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

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

Preparación del control positivo

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

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

Preparación de la reacción

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

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

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

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

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 en el canal FAM y ROX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM y de ROX.

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

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Gen ORF1ab (FAM)	Gen N (ROX)	Control Interno HEX	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo
-	-	+	-	+	SARS-CoV-2 Negativo
+	-*	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positivo*
-**	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Negativo**
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

* Repetir la extracción y el ensayo de nuevo, en caso de que gen *N* continúe siendo negativo la interpretación será SARS-CoV-2 Positivo.

** Repetir la extracción y el ensayo de nuevo, si el gen *ORF1ab* continúa siendo negativo la interpretación será SARS-CoV-2 Negativo (Posibles infecciones de otros coronavirus).

Si las muestras negativas no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

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

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

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

Se realizó otra evaluación clínica del test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 con 34 frotis orofaríngeos artificiales recolectados en medios de transporte viral (VTM). Se

contaminaron 10 frotis orofaríngeos negativos con RNA de la cepa Human 2019-nCoV BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, y por otro lado se contaminaron otras 12 muestras negativas con concentraciones conocidas de cDNA molde de cada diana. Todas ellas fueron analizadas a ciegas. 33/34 muestras enriquecidas se detectaron correctamente.

Estos resultados indican la alta sensibilidad y especificidad para detectar SARS-CoV-2 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

Sensibilidad analítica

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

Especificidad analítica

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

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 2022	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	Virus Parainfluenza humanos 1, 2, 3 y 4
<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus metapneumovirus humano A y B
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Virus rinovirus humano tipo C
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Adenovirus Tipo 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41
<i>Legionella bozemanii</i>	Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015 (H1N1)pdm09	Bocavirus humano
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2)	Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 and HKU1
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Coronavirus MERS
<i>Legionella longbeache</i>	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014(H3N2)	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando RNA extraído a partir del virus Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 como molde.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- 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)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

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

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por SARS-CoV-2. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de frotis nasofaríngeo y orofaríngeo. 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con SARS-CoV-2, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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
Cepheid
SmartCycler®
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™ 2Real-Time PCR Detection System
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
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	
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	
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	HEX	
	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
DTlite 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

Intended use

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 allows the qualitative detection of 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) by real-time RT-PCR in respiratory samples. The product is intended for use in the diagnosis of SARS-CoV-2 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, low profile 7041046

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 4 x 8-well strip, high profile 7042046

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
<i>7041S046/ 7042S046</i>	SARS-CoV-2 strips	-	4x8-well strip
<i>7C046</i>	SARS-CoV-2 Positive Control	red	1 vial
<i>7001A</i>	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
<i>7002B</i>	Rehydration Buffer	green	1 vial x 1 mL
<i>7003N</i>	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
<i>7004O</i>	Optical caps	-	4x8 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. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

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

Summary

In December 2019 in Wuhan (Hubei, China) certain people who lived or worked near a seafood market presented pneumonia of unknown cause. The sequencing of the respiratory samples determined the presence of a new type of coronavirus, 2019 new coronavirus (2019-nCoV).

Coronaviruses are non-segmented positive stranded RNA viruses that belong to the *Coronaviridae* family. Six coronavirus species that cause human diseases are known: 229E, OC43, NL63, HKU1, SARS-CoV, and, MERS-CoV. The first four cause symptoms of a common cold, while the last two are zoonotic and cause more severe complications.

Transmission of this virus is occurring from person to person, even during the asymptomatic incubation period. 2019-nCoV causes severe respiratory disease such as that produced by SARS-CoV. Pneumonia is the main associated disease, although some patients have developed pulmonary edema, severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome or multi-organ failure and death. It also causes less common symptoms such as headache, sore throat, diarrhea and vomiting. The symptoms of 2019-nCoV can appear in just two days or up to 14 days after exposure, the most common cough, fever, dyspnea and myalgia.

The samples recommended by the WHO for the identification of 2019-nCoV are those from the lower respiratory tract (sputum, bronchoalveolar lavage or endotracheal aspirates). If this is not possible, samples of the upper respiratory tract, blood, urine and feces will be taken.

The 2019-nCoV diagnosis was made by detecting the conventional causes of early pneumonia and by massive sequencing or real-time RT-PCR methods.

Principle of the test

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

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

whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For *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 broken or if the foil has been broken or damaged.
- 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.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

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

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

Positive control preparation

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

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

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

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

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for SARS-CoV-2, which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for SARS-CoV-2 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

<i>ORF1ab</i> gene (FAM)	<i>N</i> gene (ROX)	Internal Control HEX	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positive
-	-	+	-	+	SARS-CoV-2 Negative
+	-*	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Positive*
-**	+	+/-	-	+	SARS-CoV-2 Negative**
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

* Repeat the extraction and test again, in case of *N* gene is still negative the interpretation is SARS-CoV-2 Positive.

** Repeat the extraction and test again, if *ORF1ab* gene is still negative the interpretation is SARS-CoV-2 Negative (Possible infections of another coronavirus).

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

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

Another clinical evaluation of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 was conducted with 34 contrived oropharyngeal swabs collected in viral transport media (VTM). 10 negative oropharyngeal swabs were spiked with RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, and another 12 negative specimens were spiked with a known concentration of each cDNA control templates and were tested blindly. 33/34 spiked samples were detected correctly by Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

These results indicate the high sensitivity and specificity to detect SARS-CoV-2 using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR SARS-CoV-2.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of SARS-CoV-2 template ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction for *ORF1ab* and *N* genes.

Analytical specificity

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

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Human metapneumovirus A and B
<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Influenza A/California/7/2009(H1N1) virus	Human rhinovirus type C
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	Human Adenovirus Types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
<i>Legionella bozemanii</i>	Influenza A/Singapore/GP1908/2015 (H1N1)pdm09 virus	Human Bocavirus
<i>Legionella micdadei</i>	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2) virus	Respiratory Syncytial virus (RSV) A and B
<i>Legionella dumoffii</i>	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	MERS Coronavirus
<i>Legionella longbeache</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) virus	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 was confirmed by the real-time amplification using RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1 as template.

Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ⁱⁱ

- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of SARS-CoV-2 infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with nasopharyngeal swab and oropharyngeal swab. 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. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

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

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	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
	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:

REAL-TIME PCR 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	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcyler® 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	
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	HEX	
	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	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Niu, P. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*.
2. Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., ... & Xia, J. A. (2020). Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*.
3. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... & Cheng, Z. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*.
4. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*.
5. 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*.
6. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed February 2020.
7. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Interim guidance v3. 31 January 2020. Available from [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)) Accessed February 2020.
8. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance.14 January 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed February 2020.
9. World Health Organization. MERS situation update. December 2019. Available from <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1> Accessed February 2020.
10. World Health Organization. Novel Coronavirus(2019-nCoV). Situation Report – 14. Data as reported by 3 February 2020. Available from https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200203-sitrep-14-ncov.pdf?sfvrsn=f7347413_2 Accessed February 2020.
11. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Available from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> Accessed February 2020.

Trademarks

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

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

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










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

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

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

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid

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

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



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

www.vitassay.com