

Vitassay qPCR

MERS-CoV

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de MERS Coronavirus en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of MERS-Coronavirus in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR MERS-CoV permite la detección específica de MERS Coronavirus mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por MERS-Coronavirus.

Referencias

Vitassay qPCR MERS-CoV 8x8-well strip, low profile	7041039
Vitassay qPCR MERS-CoV 8x8-well strip, high profile	7042039

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S039A/ 7042S039A	MERS-Cov 1 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S039B/ 7042S039B	MERS-Cov 2 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C039	MERS-Cov 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	-	8 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 a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los coronavirus humanos (HCoV) son virus encapsulados de RNA de cadena positiva clasificados dentro de la familia *Coronaviridae* (género, Coronavirus). De entre todos, existen seis coronavirus (HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 y MERS-CoV) conocidos por infectar a los humanos.

La infección de los cuatro HCoV se asocia con diferentes síntomas respiratorios (fiebre, tos, rinorrea, bronquitis, etc.) y a menudo conduce a una enfermedad leve y autolimitada. Solo unos pocos casos se asocian con neumonía severa llegando a presentar resultados fatales. Además, la infección con los cuatro HCoV también podría estar involucrada en disfunciones digestivas.

El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) es un virus respiratorio de origen nuevo y desconocido con diversidad genotípica y fenotípica; así, este virus puede mutar, aumentando su virulencia e incluso causando tropismo tisular. Hay una tasa de mortalidad de alta frecuencia de alrededor del 50%. Los síntomas varían desde síntomas respiratorios asintomáticos o leves hasta enfermedad respiratoria aguda y muerte. La transmisión entre humanos ocurre a través de secreciones respiratorias (tos, estornudos) de personas infectadas.

El MERS-CoV se reportó por primera vez en Arabia Saudita en septiembre de 2012. Con el aumento del número de infecciones y muertes por el MERS-CoV, el desarrollo de un kit rápido y confiable es crucial para evitar una mayor propagación del MERS-CoV.

Desafortunadamente, en la actualidad, no hay tratamientos específicos para esta enfermedad mortal, y no hay vacuna. En ausencia de un tratamiento efectivo, los controles de infección apropiados incluyen diagnósticos rápidos. Actualmente, los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) se utilizan para la detección de MERS-CoV.

Principio del test

Vitassay qPCR MERS-CoV realiza la detección de coronavirus MERS mediante la retrotranscripción en un solo paso y una amplificación a tiempo real. 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 del virus se realiza mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR MERS-CoV, 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. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción para la detección de una región conservada *upstream* del gen *E* de MERS Coronavirus (*MERS-Cov 1*) cuya detección se produce en el canal FAM. La segunda tira contiene la mezcla de reacción para la detección del *open reading frame* 1a de MERS Coronavirus (*MERS-Cov 2*). La amplificación de MERS Coronavirus se detecta en el canal FAM. Ambas reacciones contienen un control interno (CI) que se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- 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:

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del *MERS-Cov* Positive Control (tubo rojo) con 200 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 DNA 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:

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 (MERS-CoV), HEX, JOE o VIC (Control Interno. En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System 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 a 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 los canales del panel de virus respiratorios.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal en el pocillo del control negativo.

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.

Interpretación de los resultados:

Primera mezcla de reacción para MERS Coronavirus (Screening)

MERS-Cov 1 (FAM)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	MERS Coronavirus Positivo
-	+	-	+	MERS Coronavirus Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Segunda mezcla de reacción para MERS Coronavirus (Confirmación)

MERS-Cov 2 (FAM)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	MERS Coronavirus Positivo
-	+	-	+	MERS Coronavirus Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Para confirmar la presencia de MERS Coronavirus, ambas reacciones deben ser positivas.

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

Para analizar la sensibilidad y la especificidad clínica se realizaron ensayos con paneles de evaluación de la calidad externa (EQA): QCMD 2016 y 2017 MERS Coronavirus EQA Programme, INSTAD e.V's Virus Genome Detection – Coronaviruses 2016 y 2017 y NEQAS for Microbiology – Molecular detection of respiratory viruses program 2017-2018. Los paneles constaron de 46 muestras clínicas (muestras en medio de transporte, lisados celulares, frotis simulados nasofaríngeos y de garganta y aspirados nasofaríngeos). Los resultados se contrastaron con los resultados de los informes finales de estos programas. Todas las muestras positivas para MERS Coronavirus fueron correctamente detectadas (18/46) utilizando el kit qPCR MERS-CoV, además no se detectó MERS Coronavirus tanto en las muestras negativas para este patógeno, como en las muestras negativas para MERS Coronavirus pero positivas para otros tipos de coronavirus como Coronavirus OC43 o NL63.

Los resultados dan una alta especificidad y sensibilidad para detectar MERS Coronavirus utilizando Vitassay qPCR MERS-CoV.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA viral por reacción.

Especificidad analítica

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

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Bordetella pertussis</i>	Metapneumovirus A y B humano	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Coronavirus 229E humano	Virus Respiratorio Sincitial (RSV)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rhinovirus humano	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Coronavirus OC43 humano	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Legionella micdadei</i>	Adenovirus humano	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like
<i>Legionella dumoffii</i>	Coronavirus NL63 humano	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Legionella longbeachae</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Legionella bozemanii</i>		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR MERS-CoV ha sido evaluado frente a MERS-Coronavirus, obteniendo un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR MERS-CoV, ha sido probado en los siguientes equipos:

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

- 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 con RNA extraído de muestras respiratorias disueltas en medio de transporte. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes virus, 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/AriaDx 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 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast 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™/CFX96™ IVD 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 System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ / CFX96™ IVD 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	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
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 MERS-CoV allows the specific detection of MERS Coronavirus in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of MERS-Coronavirus in combination with clinical and epidemiological risk factors alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR MERS-CoV 8x8 -well strip, low profile 7041039

Vitassay qPCR MERS-CoV 8x8 -well strip, high profile 7042039

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S039A/ 7042S039A	MERS-Cov 1 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S039B/ 7042S039B	MERS-Cov 2 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C039	MERS-Cov 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	-	8 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. 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

- 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

Human coronaviruses (HCoVs) are positive-stranded, enveloped RNA viruses classified within the family Coronaviridae (genus, Coronavirus). Six coronaviruses (HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, and MERS-CoV) are known to infect humans.

The infection of the four HCoVs was associated with a range of respiratory symptoms (e.g., fever, cough, rhinorrhea, bronchitis, etc.) and often led to mild, self-limiting disease. Only few cases with infection of the four HCoVs were associated with pneumonia requiring hospitalization, and even fatal outcomes. Furthermore, infection with the four HCoVs might be also involved in digestive dysfunctions.

Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) is a new and unknown origin respiratory virus with genotypic and phenotypic diversity; thus, this virus can mutate, increasing its virulence and even causing tissue tropism. There is a high-frequency mortality rate around > 50%. Symptoms range from asymptomatic or mild respiratory symptoms to acute respiratory disease and death. Transmission between humans occurs through respiratory secretions (coughing, sneezing) of infected people.

MERS-CoV, was first reported in Saudi Arabia in September of 2012. With increasing numbers of infections and deaths from MERS-CoV, development of a rapid and reliable kit was crucial to prevent further spread of MERS-CoV.

Unfortunately, at present, there are no specific treatments for this deadly disease, and no vaccine. In the absence of an effective treatment, the appropriate infection controls include rapid diagnostics. Currently, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) assays are used for detection of MERS-CoV.

Principle of the test

Vitassay qPCR MERS-CoV performs the detection of MERS Coronavirus by retrotranscription in a single step and a real-time amplification of a target region. Extracted viral RNA is transcribed to cDNA using a specific primer by a reverse transcription step followed by the polymerase chain reaction. The presence of the viruses is carried out by means of an increase in the fluorescence observed during the reaction, after the hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR MERS-CoV, it is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in stabilized format to carry out the PCR in real time. Each kit includes two types of strips and each of them corresponds to a different test. The first

strip contains the multiplex reaction mixture for the detection of a conserved region *upstream* of the *E* gene for MERS Coronavirus. After the amplification reaction, *MERS-Cov 1* is detected in the FAM channel. The second strip contains the multiplex reaction mixture for the detection of the *open reading frame 1a* for MERS Coronavirus (*MERS-Cov 2*). After the amplification reaction, MERS-CoV 2 is detected in the FAM channel. Both reaction strips contain an internal control (IC) which is detected in the HEX, VIC or JOE channel (Choose the most appropriated channel, Annex 2).

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).

RIDA® Xtract (r-Biopharm).

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MERS-Cov Positive Control (red tube) in the 200 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 (MERS-CoV), 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 FAM (MERS-CoV), and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM (MERS-CoV) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)) 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 following:

Interpretation of results MERS-CoV strips:

First reaction mix for the detection MERS Coronavirus (Screening)				
MERS-Cov 1 (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	MERS Coronavirus Positive
-	+	-	+	MERS Coronavirus Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail
Second reaction mix for the detection MERS Coronavirus (Confirmation)				
MERS-Cov 2 (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	MERS Coronavirus Positive
-	+	-	+	MERS Coronavirus Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

To confirm the presence of MERS Coronavirus, positive result is needed in both reactions.

If the negative samples do 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 must 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

The sensitivity and clinical specificity was evaluated using different external evaluation panels: QCMD 2016 and 2017 panels for MERS Coronavirus EQA Programme, INSTAD E.V's Virus Genome Detection – Coronaviruses 2016 and 2017 and NEQAS for Microbiology: -Molecular detection of respiratory viruses program 2017-2018. These panels have 46 clinical samples (samples in transport medium, cell lysates, simulated nasopharyngeal, throat swabs and nasopharyngeal aspirates). The results were compared with those presented by EQA programme final reports. All positive samples for MERS Coronavirus samples were reported as positive (18/46) using qPCR MERS-CoV. In addition, all samples negative for MERS Coronavirus were detected as negative, besides, samples that were negative for MERS Coronavirus but positive for other viruses (which include Coronavirus OC43 or Coronavirus NL63) could be confirmed.

The results show a high sensitivity and specificity to detect MERS-CoV using Vitassay qPCR MERS-CoV.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of MERS-Cov 1 and MERS-Cov 2 templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for MERS Coronavirus was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross reactivity testing		
<i>Bordetella pertussis</i>	Human Metapneumovirus A and B	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus
<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Human Coronavirus 229E	Respiratory Syncytial Virus (RSV)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Human Rhinovirus	Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8) virus
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Human Coronavirus OC43	Haemophilus influenzae
<i>Legionella micdadei</i>	Human Adenovirus	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus
<i>Legionella dumoffii</i>	Human Coronavirus NL63	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus
<i>Legionella longbeachae</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Virus Influenza B/Florida/04/06 virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Moraxella catarrhalis	Parainfluenza 1, 2, 3 and 4 virus
<i>Legionella bozemanii</i>		

Analytical reactivity

Vitassay qPCR MERS-CoV has been evaluated against MERS Coronavirus showing positive results.

Compatible real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast 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 placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with RNA extracted from respiratory samples dissolved in transport medium. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different virus, 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
Agilent Technologies
AriaMx/AriaDx 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 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast 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™ / CFX96™ IVD 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

High profile Block Thermocyclers
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ / CFX96™ IVD 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

* 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	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

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

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

Bibliography/Bibliografía

1. Ryan K. Dare, Alicia M. Fry, Malinee Chittaganpitch, Pathom Sawanpanyalert, Sonja J. Olsen, and Dean D. Erdman. Human Coronavirus Infections in Rural Thailand: A Comprehensive Study Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *The Journal of Infectious Diseases*, 196:1321–8.
2. Jane K., Emily T. M., Judson H., Nancy W., Rhoda M., Janet A. E. PEDIATRICS Volume 119, Number 1, January 2007.
3. Zhenzhou W., Ya'nan Z., Zhixiang H., Jia L., Ke L., Yihong H. and Chiyu Z. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17, 1880.
4. Mohammad S. H., Mahdi T., Bentolhoda Z., Morteza I., Seyed H, Mohammad N., Behzad K. and Ruhollah D. Development of Dual TaqMan Based One-Step rRT-PCR Assay Panel for Rapid and Accurate Diagnostic Test of MERS-CoV: A Novel Human Coronavirus, Ahead of Hajj Pilgrimage. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2016; 18(11).

Trademarks

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

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

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ 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