

# Vitassay qPCR

## HCoV

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de las cepas Coronavirus 229E, NL63, OC43 y/o HKU1 en muestras respiratorias procedentes de pacientes.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Coronavirus 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 strains in respiratory samples from patients.



## Uso previsto

Vitassay qPCR HCoV permite la detección y diferenciación de los subtipos de de las cepas Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1 mediante RT-PCR a tiempo real en muestras respiratorias. El objetivo de este producto es facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1.

## Referencias

Vitassay qPCR HCoV 4x8 -well strip, low profile	7041040
Vitassay qPCR HCoV 4x8-well strip, high profile	7042040

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S040/ 7042S040	HCoV strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C040	HCoV 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

## 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 son virus con RNA encapsulado los cuales se dividen en 6 grupos: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, los del síndrome respiratorio del medio este (MERS-CoV) y los asociados con el síndrome agudo respiratorio (SARS-CoV). Los coronavirus fueron identificados por primera vez a mediados de los años 60 como una de las principales causas del resfriado común. Los síntomas de la infección, una vez pasado el periodo de incubación, es fiebre de 1 a 5 días. En los casos más graves puede llegar a causar falta de aliento, síntomas gastrointestinales, náuseas, vómitos, fatiga y mialgia y tener una mayor duración.

La transmisión del virus puede ocurrir entre personas mediante la inhalación de gotitas de agua provenientes de la tos o el estornudo o por transmisión indirecta al estar en contacto con materiales contaminados como equipos superficies y dispositivos. El periodo de incubación de la enfermedad es de 5 a 12 días.

Las tres cepas tienen una sintomatología muy parecida y la poca efectividad de los métodos microbiológicos hacen que la PCR en tiempo real es uno de los métodos más efectivos al mejorar la poca especificidad de los otros métodos. Esta técnica permite detectar el gen replicasa en la cepa HKU1 y el gen de la nucleoproteína en las cepas 229E, NL63 y OC43.

## Principio del test

VITASSAY qPCR HCoV se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen de la nucleoproteína en las cepas 229E, NL63, OC43 y HKU1 en muestras respiratorias. 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 RNA viral se confirma mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

VITASSAY qPCR HCoV, 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. La amplificación de la secuencia diana se detecta en los canales FAM

(Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) y HEX, VIC o JOE (Coronavirus HKU1). Elegir canal según el equipo utilizado, ver Adjunto II.

## 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 del RNA 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)

### Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del HCoV Positive Control (tubo rojo) en 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 demás 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:

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 elongación/hibridación (\*) a través de los canales FAM (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) y HEX, VIC o JOE (Coronavirus HKU1). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System 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 estudiadas 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 FAM (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) y HEX, VIC o JOE (Coronavirus HKU1).

#### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) y HEX, VIC o JOE (Coronavirus HKU1).

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

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

Coronavirus 229E (FAM)	Coronavirus HKU1 (HEX)	Coronavirus NL63 (ROX)	Coronavirus OC43 (Cy5)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+	-	+	Coronavirus 229E, HKU1, NL63 y OC43 Positivos
-	-	-	-	-	+	Coronavirus 229E, HKU1, NL63 y OC43 Negativos
+	-	-	-	-	+	Coronavirus 229E Positivo, Coronavirus HKU1, NL63 y OC43 Negativos
-	+	-	-	-	+	Coronavirus HKU1 Positivo, Coronavirus 229E, NL63 y OC43 Negativos
-	-	+	-	-	+	Coronavirus NL63 Positivo, Coronavirus 229E, HKU1 y OC43 Negativos
-	-	-	+	-	+	Coronavirus OC43 Positivo, Coronavirus 229E, HKU1 y NL63 Negativos
+	+	-	-	-	+	Coronavirus 229E y HKU1 Positivos, Coronavirus NL63 y OC43 Negativos
+	-	+	-	-	+	Coronavirus 229E y NL63 Positivos, Coronavirus HKU1 y OC43 Negativos
+	-	-	+	-	+	Coronavirus 229E y OC43 Positivos, Coronavirus HKU1 y NL63 Negativos
-	+	+	-	-	+	Coronavirus HKU1 y NL63 Positivos, Coronavirus 229E y OC43 Negativos
-	+	-	+	-	+	Coronavirus HKU1 y OC43 Positivos, Coronavirus 229E y NL63 Negativos
-	-	+	+	-	+	Coronavirus NL63 y OC43 Positivos, Coronavirus 229E y HKU1 Negativos
+	+	+	-	-	+	Coronavirus 229E, HKU1 y NL63 Positivos, Coronavirus OC43 Negativo
-	+	+	+	-	+	Coronavirus HKU1, NL63 y OC43 Positivos, Coronavirus 229E Negativo
+	-	+	+	-	+	Coronavirus 229E, NL63 y OC43 Positivos, Coronavirus HKU1 Negativo
+	+	-	+	-	+	Coronavirus 229E, HKU1 y OC43 Positivos, Coronavirus NL63 Negativo
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los virus 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 positivo y uno negativo en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

## Características técnicas

### Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 45 muestras clínicas procedentes de los paneles EQA fueron analizadas mediante Vitassay qPCR HCoV.

Vitassay qPCR HCoV detectó la presencia de Coronavirus 229E en 7 muestras de las 45 totales.

Vitassay qPCR HCoV detectó la presencia de Coronavirus HKU1 en 1 muestra de las 45 totales

Vitassay qPCR HCoV detectó la presencia de Coronavirus NL63 en 11 muestras de las 45 totales.

Vitassay qPCR HCoV detectó la presencia de Coronavirus OC43 en 18 muestras de las 45 totales.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR HCoV.

### Sensibilidad analítica

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

### Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1 fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Bordetella holmesii</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella bozemanii</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Virus parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Metapneumovirus A y B humano
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 A(H3N2)	Coronavirus humano 229E, OC43 y NL63
<i>Legionella longbeachae</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	MERS Coronavirus
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/ 2014 (H5N8)	Rhinovirus humano
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)	Adenovirus humano
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Virus respiratorio sincitial RSV
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A y C
Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015	Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014(H3N2)	Bocavirus humano

### Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR HCoV fue evaluada frente a las siguientes cepas: Coronavirus humanos 229E, NL63, OC43 y HKU1 obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

### Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR HCoV ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- 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® (Qiagen)<sup>I</sup>

- SmartCycler® (Cepheid)<sup>1</sup>

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 equipos Applied Biosystems con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

### **Limitaciones**

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por los Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1. 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 RNA extraído de frotis faríngeo. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1, 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
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
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
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

**Intended use**

Vitassay qPCR HCoV allows the detection and differentiation of Coronavirus 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 subtypes by real-time RT-PCR in respiratory samples. The product is intended for use in the diagnosis of Coronavirus 229E, NL63, OC43 and/or HKU1 subtypes infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

**References**

- Vitassay qPCR HCoV 4x8 -well strip, low profile 7041040
- Vitassay qPCR HCoV 4x8-well strip, high profile 7042040

**Materials/reagents provided**

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S040/ 7042S040	HCoV strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C040	VITASSAY qPCR HCoV 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

**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
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

**Summary**

Coronaviruses are enveloped RNA viruses and are subdivided in 6 groups: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, severe acute respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). Coronaviruses were first identified in the mid-1960s as one of the main causes of the common cold. The symptoms of the infection, once past the incubation period, is fever of 1 to 5 days. In the most severe cases it can cause shortness of breath, gastrointestinal symptoms, nausea, vomiting, fatigue and myalgia and have a longer duration.

The transmission of the virus can occur between people by inhaling droplets of water from coughs or sneezes or by indirect transmission when in contact with contaminated materials such as equipment, surfaces and devices. The incubation period of the disease is 5 to 12 days.

The three strains have very similar symptoms and the low effectiveness of the microbiological methods make real-time PCR one of the most effective methods to improve the low specificity of the other methods. This technique makes it possible to detect the replicase gene in the HKU1 strain and the nucleoprotein gene in strains 229E, NL63 and OC43.

**Principle of the test**

Vitassay qPCR HCoV test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of a conserved region of the *nucleoprotein* gene for strains 229E, OC43, NL63 and HKU1 and the as targets, using specific primers and a fluorescent-labelled probes. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately by polymerase chain reaction. The presence of the RNA viral is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR HCoV test 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 internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the target sequence is detected in the FAM (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) and HEX, VIC or JOE channels (Coronavirus HKU1). Choose channel according to the equipment used, see Annex II.

## 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 RNA 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 (Strattec)

### Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized HCoV Positive Control (red tube) in 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 (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) and HEX, VIC or JOE channels (Coronavirus HKU1). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

### **Analysis and interpretation of results**

The 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 (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) and/or HEX, VIC or JOE channels (Coronavirus HKU1), which validates the reaction.

#### **Negative control**

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM (Coronavirus 229E), ROX (Coronavirus NL63), Cy5 (Coronavirus OC43) and HEX, VIC or JOE channels (Coronavirus HKU1), 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:

Coronavirus 229E (FAM)	Coronavirus HKU1 (HEX)	Coronavirus NL63 (ROX)	Coronavirus OC43 (Cy5)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+	-	+	Coronavirus 229E, HKU1, NL63 and OC43 Positive
-	-	-	-	-	+	Coronavirus 229E, HKU1, NL63 and OC43 Negative
+	-	-	-	-	+	Coronavirus 229E Positive, Coronavirus HKU1, NL63 and OC43 Negative
-	+	-	-	-	+	Coronavirus HKU1 Positive, Coronavirus 229E, NL63 and OC43 Negative
-	-	+	-	-	+	Coronavirus NL63 Positive, Coronavirus 229E, HKU1 and OC43 Negative
-	-	-	+	-	+	Coronavirus OC43 Positive, Coronavirus 229E, HKU1 and NL63 Negative
+	+	-	-	-	+	Coronavirus 229E and HKU1 positive, Coronavirus NL63 and OC43 Negative
+	-	+	-	-	+	Coronavirus 229E and NL63 positive, Coronavirus HKU1 and OC43 Negative
+	-	-	+	-	+	Coronavirus 229E and OC43 positive, Coronavirus HKU1 and NL63 Negative
-	+	+	-	-	+	Coronavirus HKU1 and NL63 positive, Coronavirus 229E and OC43 Negative
-	+	-	+	-	+	Coronavirus HKU1 and OC43 positive, Coronavirus 229E and NL63 Negative
-	-	+	+	-	+	Coronavirus NL63 and OC43 positive, Coronavirus 229E and HKU1 Negative
+	+	+	-	-	+	Coronavirus 229E, HKU1 and NL63 Positive, Coronavirus OC43 Negative
-	+	+	+	-	+	Coronavirus HKU1, NL63 and OC43 Positive, Coronavirus 229E Negative
+	-	+	+	-	+	Coronavirus 229E, NL63 and OC43 Positive, Coronavirus HKU1 Negative
+	+	-	+	-	+	Coronavirus 229E, HKU1 and OC43 Positive, Coronavirus NL63 Negative
+	+	+	+	+	+	Experiment Fail
-	-	-	-	-	-	Experiment Fail

**(+) Positive:** Amplification signal

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

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 has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

### Quality Control

An Internal Control (IC) is included in each reaction for confirming the appropriate performance of the molecular diagnostic technique. 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 45 clinical samples from the EQA panels were tested by Vitassay qPCR HCoV.

Vitassay pPCR HCoV detected Coronavirus 229E in 7 of the 45 clinical samples tested.

Vitassay qPCR HCoV detected Coronavirus HKU1 in 1 of the 45 clinical samples tested.

Vitassay qPCR HCoV detected Coronavirus NL63 in 11 of the 45 clinical samples tested.

Vitassay qPCR HCoV detected Coronavirus OC43 in 18 of the 45 clinical samples tested.

The result of Vitassay qPCR HCoV kit were concordant for all the samples. The results show a high sensitivity and specificity to detect Coronavirus 229E, NL63, OC43 and HKU1 using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR HCoV.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of each virus templates ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  viral RNA copies per reaction.

### Analytical specificity

The analytical specificity for Coronavirus 229E, NL63, OC43 y HKU1 was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity testing		
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae MinnA</i>	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008-like
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Virus Influenza B/Florida/04/06
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Chlamydia psittaci</i> genotypes A and C	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
<i>Legionella micdadei</i>	Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Human metapneumovirus A and B
<i>Legionella dumoffii</i>	Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)	Human coronavirus 229E, OC43 and NL63
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	MERS Coronavirus
<i>Legionella longbeachea</i>	Virus Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)	Human rhinovirus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	Human Adenovirus
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Respiratory Syncytial virus (RSV)
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Virus Influenza A/Turkey/Germany R2485+86/2014 (H5N8)	Human Bocavirus
Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus	Influenza A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) virus	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8)

### Analytical reactivity

The reactivity of de Vitassay qPCR HCoV was evaluated against the strains: Human coronavirus 229E, NL63, OC43 and HKU1, showing positive result in all of them.

### Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR HCoV has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)<sup>1</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>1</sup>

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 Applied Biosystems with strips it is recommend to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

### **Limitations**

- This test provides a presumptive diagnosis of Coronavirus 229E, NL63, OC43 and HKU1 infection. 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 throat samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different viruses, 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
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

High profile Block Thermocyclers
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
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
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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:

<b>Thermocycler</b>	<b>Vitassay channel</b>	<b>Exposure values</b>
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	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* 2007; 196:1321–8
2. Narrative review of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection: updates and implications for practice, Abbas Al Mutair and Zainab Ambani. *Journal of International Medical Research*, 0(0) 1–6
3. Susan S. Chiu, Kwok Hung Chan, Ka Wing Chu, See Wai Kwan, Yi Guan, Leo Lit Man Poon and J. S. M. Peiris. Human Coronavirus NL63 Infection and Other Coronavirus Infections in Children Hospitalized with Acute Respiratory Disease in Hong Kong, China. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:1721–9 2005 by the Infectious Diseases Society of America
4. Kate E. Templeton, Sitha A. Scheltinga, Willian C. J. F. M. van den Eeden, A. Willy Graffelman, Peterhans J. van den Broek and Eric C. J. Claas. Improved Diagnosis of the Etiology of Community-Acquired Pneumonia with Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41:345–51

## 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 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





