

Vitassay qPCR

SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de virus SARS-CoV-2, Influenza A (Flu A) y/o, Influenza B (Flu B) en muestras respiratorias.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2, Influenza A (Flu A) and/or, Influenza B (Flu B) virus, in respiratory samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B permite la detección cualitativa de los virus SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B mediante RT-PCR en tiempo real en frotis nasofaríngeo y orofaríngeo. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los virus SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 4 x 8-well strip, low profile	7041054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 4 x 8-well strip, high profile	7042054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 96-well plate, low profile	7091054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 96-well plate, high profile	7092054

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041054 y 7042054:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S054/ 7042S054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Reactivos suministrados para las referencias 7091054 y 7092054:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P054/ 7092P054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Plate low/high profile	-	1 placa
7C054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	12 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación.

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

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- 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

Los coronavirus son virus RNA monocatenarios no segmentados que pertenecen a la familia *Coronaviridae* del orden *Nidovirales*. Previamente se han identificado seis tipos de CoV humanos: NL63, 229E, OC43 y HKU1 que causan enfermedad del tracto respiratorio superior y síntomas de resfriado común y el coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS- CoV) que son altamente patógenos en humanos, con altas tasas de neumonía severa y desenlace fatal.

En diciembre de 2019, se informó un grupo de casos de neumonía en un mercado mayorista de mariscos en Wuhan, provincia de Hubei, que se descubrió que era causado por coronavirus previamente desconocidos. Se utilizaron células epiteliales de las vías respiratorias de pacientes infectados para aislar el nuevo coronavirus, llamado temporalmente 2019-nCoV. Más tarde, se descubrió que el nuevo coronavirus está relacionado con el SARS-CoV pero es lo suficientemente divergente del SARS-CoV como para ser considerado un nuevo betacoronavirus que infecta a los humanos. Por ello, el Comité Internacional para la Clasificación de Virus designó el nombre de este coronavirus como coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2). La Organización Mundial de la Salud ha denominado la enfermedad causada por el SARS-CoV-2 como enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19).

Las personas con COVID-19 han informado de una amplia gama de síntomas, que van desde síntomas leves hasta enfermedades graves. Los síntomas incluyen fiebre o escalofríos, tos, falta de aire o dificultad para respirar, fatiga, dolores musculares o

corporales, dolor de cabeza, pérdida del gusto o del olfato, dolor de garganta, congestión o secreción nasal, náuseas o vómitos y diarrea. Los síntomas pueden aparecer de 2 a 14 días después de la exposición al virus. Las personas mayores y aquellas con problemas médicos subyacentes como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad grave y la infección puede progresar a neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda e insuficiencia multiorgánica. La tasa de mortalidad varía del 3% al 4%.

La COVID-19 puede transmitirse de persona a persona a través de varias rutas diferentes. El SARS-CoV-2 se transmite principalmente a través de gotitas de saliva o secreciones nasales cuando una persona infectada tose o estornuda, pero también por contacto directo con un sujeto infectado o contacto indirecto (a través de la transferencia del virus a través de las manos desde los objetos contaminados a la boca, nariz u ojos). La transmisión de este virus se produce de persona a persona, incluso durante el período de incubación asintomático.

La OMS recomienda, para todos los casos sospechosos, la recolección de muestras de las vías respiratorias superiores (URT) (nasofaríngeas y orofaríngeas) para su análisis mediante RT-PCR y, cuando persista la sospecha clínica y las muestras de URT sean negativas, recolectar muestras de las vías respiratorias inferiores (LRT) cuando estén disponibles (esputo expectorado o aspirado endotraqueal / lavado broncoalveolar en pacientes ventilados). Se pueden recolectar muestras clínicas adicionales ya que se ha detectado el virus COVID-19 en sangre y heces.

Las pruebas de diagnóstico para el SARS-CoV-2 se realizan actualmente mediante escáner de tórax, secuenciación del genoma completo y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (rRT-PCR).

La gripe es una enfermedad respiratoria contagiosa causada por los virus influenza que resulta en una morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas significativas. Los virus influenza son miembros de la familia *Orthomyxoviridae*. Hay cuatro tipos de virus influenza: A, B, C y D. Los virus influenza A y B son los dos tipos principales que causan epidemias estacionales casi todos los inviernos. En todo el mundo, se estima que estas epidemias anuales provocan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves y entre 290 000 y 650 000 muertes respiratorias.

Los virus influenza son virus RNA monocatenarios de sentido negativo. El genoma viral de influenza está compuesto por ocho segmentos. Los virus influenza A se clasifican además en subtipos según las combinaciones de hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las proteínas de la superficie del virus. Los virus influenza B se clasifican además en dos linajes: B / Yamagata y B / Victoria. Tanto los virus influenza A como los B se pueden clasificar en grupos y subgrupos específicos.

Los virus de la gripe se transmiten principalmente por pequeñas gotitas que se forman cuando las personas con gripe tosen, estornudan o hablan. Estas gotitas que contienen virus se dispersan en el aire e infectan a las personas cercanas que las respiran. La propagación del virus se produce con menos frecuencia al tocar superficies contaminadas y luego tocarse los ojos, la nariz o la boca. El período de incubación es de aproximadamente 2 días, pero varía de uno a cuatro días. Algunas personas pueden infectarse con el virus de la gripe, pero no presentar síntomas. Durante este tiempo, esas personas aún pueden transmitir el virus a otras personas. Las personas con gripe son más contagiosas en los primeros 3-4 días después de que comienza su enfermedad.

La gripe puede causar una enfermedad de leve a grave y, en ocasiones, puede provocar la muerte. La gripe estacional se caracteriza por la aparición repentina de algunos o todos estos síntomas: fiebre o escalofríos, tos, dolor de garganta, secreción nasal, dolores musculares o corporales, dolores de cabeza, fatiga (cansancio) y algunas personas pueden tener vómitos y diarrea. Las personas con mayor riesgo de enfermedad grave o complicaciones cuando se infectan son las mujeres embarazadas, los niños menores de 5 años, los ancianos, las personas con afecciones médicas crónicas y las personas con afecciones inmunosupresoras (como el VIH / SIDA, que reciben quimioterapia). Las complicaciones de la gripe pueden incluir neumonía bacteriana, infecciones de oído, infecciones de los senos nasales y empeoramiento de enfermedades crónicas. Otras posibles complicaciones graves pueden incluir inflamación del corazón (miocarditis), del cerebro (encefalitis) o de los tejidos musculares (miositis) e insuficiencia multiorgánica.

La confirmación de laboratorio del virus influenza a partir de secreciones de garganta, nasales y nasofaríngeas o aspirados o lavados traqueales se realiza comúnmente mediante detección directa de antígenos, aislamiento de virus o detección de ARN específico de influenza mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B se basa en la amplificación a tiempo real de dos regiones diana conservadas del gen *N* (*N1* y *N2*) para SARS-CoV-2 y de una región diana conservada del gen *M1* para Influenza A y B. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando *primers* específicos mediante un paso de transcripción inversa seguido de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

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

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

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 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 endógeno permite el control del proceso de extracción y la detección de una posible reacción de inhibición. El ensayo utiliza un gen humano housekeeping como control interno endógeno (IC) (gen RNase P presente en el DNA humano) que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas. La amplificación de SARS-CoV-2 es detectada en el canal Cy5, la amplificación de Influenza A es detectada en el canal FAM, la amplificación de Influenza B se detecta en el canal ROX mientras que el control interno endógeno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- 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.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas y 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 optimizado compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 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) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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*)	63°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales Cy5 (SARS-CoV-2), FAM (Influenza A), ROX (Influenza B) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, 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 en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación y el procedimiento de extracción compruebe la emisión de señal de control interno endógeno (CI).

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

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

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

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva obtenida y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

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

SARS-CoV-2	Influenza A	Influenza B	Control Interno endógeno	Interpretación
+	-	-	+/- [#]	Detección RNA SARS-CoV-2
-	+	-	+/- [#]	Detección RNA Influenza A
-	-	+	+/- [#]	Detección RNA Influenza B
+	+	+	+/- [#]	Detección RNA SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B
+	+	-	+/- [#]	Detección RNA SARS-CoV-2 e Influenza A
+	-	+	+/- [#]	Detección RNA SARS-CoV-2 e Influenza B
-	+	+	+/- [#]	Detección RNA Influenza A e Influenza B
-	-	-	+	No detección RNA molde
-	-	-	-*	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

* En el caso de que la detección de las regiones diana de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control interno endógeno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

[#] En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Si las muestras no muestran un resultado positivo para el control interno endógeno, 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 endógeno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se deben 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 de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B se analizaron mediante PCR en tiempo real muestras respiratorias (nasofaríngeas y orofaríngeas) procedentes de pacientes con sospecha de infección respiratoria y los resultados se compararon con los obtenidos con tres métodos de detección molecular (Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test con el Cobas® Liat® System (Roche), Simplexa™ COVID-19 Direct kit (DiaSorin Molecular LLC, Cypress, CA), y un ensayo in-house Real time PCR (Liverpool Clinical Laboratories, UK)).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detectó 48 muestras positivas para SARS-CoV-2 de un total de 148 muestras analizadas mientras que Simplexa™ COVID-19 Direct kit (DiaSorin Molecular LLC, Cypress, CA) detectó 47 muestras positivas para SARS-CoV-2.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detectó 52 muestras positivas para Influenza A de un total de 167 muestras analizadas, al igual que Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test (Roche). Por otro lado, Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detectó 28 muestras positivas para Influenza A de un total de 46 muestras analizadas, al igual que el ensayo in-house Real time PCR (Liverpool Clinical Laboratories, UK)).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detectó 16 muestras positivas para Influenza B de un total de 167 muestras analizadas al igual que el Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test (Roche).

Estos resultados indican una alta concordancia para detectar SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B.

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/rxn para SARS-CoV-2, 10 copias/rxn para Flu A y 40 copias/rxn para Flu B.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B fue confirmada probando un panel compuesto por los patógenos respiratorios más comunes, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
Parainfluenza humanos 1, 2, 3 y 4	Virus Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) (clade 3C.3a)	Virus Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2)
<i>Bordetella pertussis</i>	Virus Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) (clade 3C.2a)	Virus Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Virus Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2)	Virus Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)
<i>Bordetella holmesii</i>	Virus Influenza A/New York/39/2012 (H3N2)	Virus Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26
<i>Bordetella parapertussis</i>	Virus Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2)	Virus Influenza B/Brisbane/60/2008
Bocavirus	Virus Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2)	Virus Influenza B/Colorado/6/2017
<i>Chlamydia caviae</i>	Virus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	Virus Influenza B/Malaysia/2506/2004
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A y C	Virus Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2)	Virus Influenza B/Maryland/15/2016
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Virus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2)	Virus Influenza B/Netherlands/207/06
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	Virus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Virus Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A)
MERS Coronavirus	Virus Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2)	Virus Influenza B/Nevada/3/2011
SARS Coronavirus Cepa Frankfurt 1	Virus Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) (Clade 3C2a.1)	Virus Influenza B/New Jersey/1/2012
SARS-CoV-2 cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	Virus Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C)	Virus Influenza B/Texas/02/2013

SARS-CoV-2 cepa 2019-nCoV/Italy-INM1	Virus Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2)	Virus Influenza B/Townsville/8/2016
SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020	Virus Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2)	Virus Influenza B/Canberra/11/2016
SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	Virus Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2)	Virus Influenza B/Florida/4/2006
SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USAWA1/2020	Virus Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1)	Virus Influenza B/Florida/07/2004
Enterovirus Echovirus 11 y 30	Virus Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1)	Virus Influenza B/Guangdong/120/2000
Enterovirus 68 y 71	Virus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1)	Virus Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39)
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	Virus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1)	Virus Influenza B/Jiangsu/10/2003
<i>Haemophilus influenzae MinnA</i>	Virus Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a	Virus Influenza B/Massachusetts/2/2012
Virus Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	Virus Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1)	Virus Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3)
Virus Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1)	Virus Influenza B/Phuket/3073/2013
Virus Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	Virus Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1)	Virus Influenza B/Texas/06/2011
Virus Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1)	Virus Influenza B/Wisconsin/1/2010
Virus Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1)	Virus Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A
Virus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1)	<i>Legionella pneumophila</i>
Virus Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1)	Virus Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29	<i>Legionella dumoffii</i>
Virus Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1)	Virus Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	<i>Legionella longbeachae</i>
Virus Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDDCRG30	<i>Legionella micdadei</i>
Virus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1)	<i>Legionella bozemanii</i>

Virus Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1)	Virus rinovirus humano tipo C
Virus Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09	Virus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Virus Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2)	Virus Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Virus Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2)	Virus Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina
Virus Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2)	Virus Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1)	Adenovirus humano tipo 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41
Virus Influenza A/Hiroshima/52/2005 (IVR-142) (H3N2)	Virus Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 y g885652
Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	Virus Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3)	Virus metapneumovirus humano A y B
Virus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	Virus Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Virus Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v	Virus Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Virus Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v	Virus Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z22
Virus Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2)	Virus Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7)	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Virus Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2)	Virus Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1	<i>Streptococcus salivarius</i>
Virus Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2)	Virus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B (cepa CH93(18)-18)
Virus Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v	Virus Influenza A/Guangdong/17SF00k3/2016 (H7N9)	Virus Respiratorio Sincitial cepa Long
Virus Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v		

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B para SARS-CoV-2 fue evaluada frente a RNA extraído a partir de las cepas: Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV cepa 2019-nCoV/Italy-INMI1,

SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USAWA1/2020, y controles de RNA sintético para dos variantes del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) y MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B para Influenza A fue evaluada frente a RNA extraído a partir de las cepas: Influenza A/PR/8/34 (H1N1), Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus, Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus,

Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) virus (Clade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus, Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B para Influenza B fue evaluada frente a RNA extraído a partir de las cepas: Influenza B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Colorado/6/2017 virus, Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus, Influenza B/Maryland/15/2016 virus, Influenza B/Netherlands/207/06 virus, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, Influenza B/Nevada/3/2011 virus, Influenza B/New Jersey/1/2012 virus, Influenza B/Texas/02/2013 virus , Influenza B/Townsville/8/2016 virus (B/linaje Victoria); Influenza B/Canberra/11/2016 virus, Influenza B/Florida/4/2006 virus, Influenza B/Florida/07/2004 virus, Influenza B/Guangdong/120/2000 virus, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) virus, Influenza B/Jiangsu/10/2003 virus, Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus, Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus, Influenza B/Phuket/3073/2013 virus, Influenza B/Texas/06/2011 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus (B/linaje Yamagata), mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B ha sido validado en los siguientes equipos:

- 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

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

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, Influenza A y/o Influenza B. 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 ácido nucleico 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 SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B 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.
- Debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original algunas muestras pueden no presentar curvas de amplificación de RNasa P. Una señal del CI negativa no impide la presencia de RNA de SARS-CoV-2, Flu A y/o Flu B en una muestra clínica.
- La detección de estos patógenos puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, incluyendo: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de RNA); c) degradación del RNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana del genoma del SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B identificadas por este test que pueden provocar que el RNA sea indetectable cuando la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la retrotranscripción y/o amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia; f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del RNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que estos patógenos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.

- Los resultados negativos no impiden la infección por SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos para la identificación de SARS-CoV-2 y la nueva cepa de Influenza A y/o la etapa de infección más adecuada para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con SARS-CoV-2, Influenza A y/o Influenza B y se han descartado otras enfermedades respiratorias, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

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 Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTiite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B allows the qualitative detection of SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B viruses by real-time RT-PCR in nasopharyngeal and oropharyngeal swabs. The product is intended for use in the diagnosis of SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B viruses' infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 4 x 8-well strip, low profile	7041054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 4 x 8-well strip, high profile	7042054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 96-well plate, low profile	7091054
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 96-well plate, high profile	7092054

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041054 and 7042054:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S054/ 7042S054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8 cap strip

Reagents provided in references 7091054 and 7092054:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P054/ 7092P054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B plate low/high profile	-	1 plate
7C054	SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	12 x 8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.

- The resuspended positive control should be stored at -20°C. 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
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Coronaviruses are unsegmented single-stranded RNA viruses belonging to family *Coronaviridae* of the order *Nidovirales*. Six kinds of human CoVs have been previously identified: *NL63*, *229E*, *OC43* and *HKU1* which cause upper respiratory tract disease and common cold symptoms and the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) which are highly pathogenic in humans, with high rates of severe pneumonia and fatal outcomes.

In December 2019, a group of pneumonia cases was reported at a wholesale seafood market in Wuhan, Hubei province, which was found to be caused by previously unknown Coronaviruses. Airway epithelial cells from infected patients were used to isolate a novel coronavirus, temporarily named 2019-nCoV. Later, it was found that the new coronavirus is related to the SARS-CoV but is sufficiently divergent from SARS-CoV to be considered a new human-infecting betacoronavirus. Therefore, the International Committee for the classification of viruses designated the name of this coronavirus as the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The World Health Organization has named the disease caused by the SARS-CoV-2 as coronavirus disease 2019 (COVID-19).

People with COVID-19 have had a wide range of symptoms reported, ranging from mild symptoms to severe illness. Symptoms include fever or chills, cough, shortness of breath or difficulty breathing, fatigue, muscle or body aches, headache, loss of taste or smell, sore throat, congestion or runny nose, nausea or vomiting and diarrhea. Symptoms may appear 2-14 days after exposure to the virus. Older people, and those with underlying medical problems like cardiovascular disease, diabetes, chronic respiratory disease, and cancer are more likely to develop serious illness and infection may progress to

pneumonia, acute respiratory distress syndrome and multi-organ failure. The fatality rate ranges from 3% to 4%.

The COVID-19 may be transmitted from person to person through several different routes. The SARS-CoV-2 spreads primarily through droplets of saliva or discharge from the nose when an infected person coughs or sneezes but also by direct contact with an infected subject or indirect contact (through hand-mediated transfer of the virus from contaminated fomites to the mouth, nose, or eyes). Transmission of this virus is occurring from person to person, even during the asymptomatic incubation period.

WHO recommend, for all suspect cases, collection of upper respiratory tract (URT) specimens (nasopharyngeal and oropharyngeal) for testing by RT-PCR and, where clinical suspicion remains and URT specimens are negative, to collect specimens from the lower respiratory tract (LRT) when readily available (expectorated sputum, or endotracheal aspirate/bronchoalveolar lavage in ventilated patient). Additional clinical specimens may be collected as COVID-19 virus has been detected in blood and stool.

Diagnostic testing for the SARS-CoV-2 is currently undertaken using chest scan, whole genome sequencing and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR).

Influenza (flu) is a contagious respiratory illness caused by influenza viruses resulting in significant morbidity, mortality and economic losses. Influenza viruses are a member of *Orthomyxoviridae* family. There are four types of influenza viruses: A, B, C and D. Influenza A and B viruses are the two main types of influenza viruses that cause seasonal epidemics almost every winter. Worldwide, these annual epidemics are estimated to result in about 3 to 5 million cases of severe illness, and about 290 000 to 650 000 respiratory deaths.

Influenza viruses are single-stranded, negative-sense RNA viruses. The influenza viral genome is composed of eight segments. Influenza A viruses are further classified into subtypes according to the combinations of the hemagglutinin (HA) and the neuraminidase (NA), the proteins on the surface of the virus. Influenza B viruses are further classified into two lineages: B/Yamagata and B/Victoria. Both influenza A and B viruses can be further classified into specific clades and sub-clades.

Flu viruses spread mainly by tiny droplets made when people with flu cough, sneeze or talk. These droplets containing viruses are dispersed into the air and infect persons in close proximity who breathe these droplets in. Spread of the virus is less often by touching contaminated surfaces and then touching the eyes, nose, or mouth. The incubation period is about 2 days but ranges from one to four days. Some people can be infected with the flu virus but have no symptoms. During this time, those people may still spread the virus to others. People with flu are most contagious in the first 3-4 days after their illness begins.

Influenza can cause mild to severe illness, and at times can lead to death. Seasonal influenza is characterized by a sudden onset of some or all of these symptoms: fever or chills, cough, sore throat, runny nose, muscle or body aches, headaches, fatigue (tiredness) and some people may have vomiting and diarrhea. People at greater risk of severe disease or complications when infected are pregnant women, children younger than 5 years old, the elderly, individuals with chronic medical conditions and individuals with immunosuppressive conditions (such as HIV/AIDS, receiving chemotherapy). Complications of flu can include bacterial pneumonia, ear infections, sinus infections and worsening of chronic medical conditions. Other possible serious complications triggered by flu can include inflammation of the heart (myocarditis), brain (encephalitis) or muscle (myositis) tissues, and multi-organ failure.

Laboratory confirmation of influenza virus from throat, nasal and nasopharyngeal secretions or tracheal aspirate or washings is commonly performed using direct antigen detection, virus isolation, or detection of influenza-specific RNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B is based on the real-time amplification of two conserved target regions of the *N* gene (N1 and N2) for SARS-CoV-2 and of a conserved target region of the *M1* gene for Influenza A and B. The extracted viral RNA is transcribed into cDNA using specific primers by reverse transcription step followed immediately by polymerase chain reaction. The presence of SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 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 endogenous internal control allows the extraction process control and the detection of a possible inhibition reaction. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (IC) (RNase P gene present in human DNA) that is expected to be present in all nucleated human cells. SARS-CoV-2 amplification is detected in the Cy5 channel, Influenza A amplification is detected in the FAM channel, Influenza B amplification is detected in the ROX channel, while the endogenous internal control (IC) is detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- 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 and they must be managed according to the national sanitary waste legislation. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

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

- Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using Maxwell® RSC 16 instrument (Promega).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots 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 (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them to the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription	45°C	15 min	1
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	63°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the annealing step (*) through the Cy5 (SARS-CoV-2), FAM (Influenza A), ROX (Influenza B) and HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (IC)) channels. If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System 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. To verify the correct operation of the amplification mix, and the extraction procedure, check the emission of the endogenous internal control (IC) signal.

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

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC or JOE channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC or JOE channels, 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.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to review all the parameters, the sigmoid shape of the obtained curve and the intensity of the fluorescence. It is recommended to repeat the test, preferably in duplicate.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

The result interpretation is summarized in the following table:

SARS-CoV-2	Influenza A	Influenza B	Endogenous Internal Control	Interpretation
+	-	-	+/- [#]	SARS-CoV-2 RNA Detection
-	+	-	+/- [#]	Influenza A RNA Detection
-	-	+	+/- [#]	Influenza B RNA Detection
+	+	+	+/- [#]	SARS-CoV-2, Influenza A and Influenza B RNA Detection
+	+	-	+/- [#]	SARS-CoV-2 and Influenza A RNA Detection
+	-	+	+/- [#]	SARS-CoV-2 and Influenza B RNA Detection
-	+	+	+/- [#]	Influenza A and Influenza B RNA Detection
-	-	-	+*	No detection of template RNA
-	-	-	-*	Experiment fail

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

* In the case of negative detection of SARS-CoV-2, Influenza A and Influenza B target regions, the IC must show an amplification signal with Ct less than 35. In the case of absence of signal or Ct value ≥ 35 of Endogenous Internal Control, the result is considered "invalid" and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR by diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and repeat the assay to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

[#] Sometimes, the detection of the internal control is not necessary, since the presence of a high initial number of copies of the target nucleic acid can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids.

If the samples do not show a positive result for the endogenous 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 Endogenous Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

In order to analyze the clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B, respiratory samples (nasopharyngeal and oropharyngeal) from patients with suspected respiratory infection were analyzed by real-time PCR and the results were compared with those obtained with three molecular detection methods (Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test with the Cobas® Liat® System (Roche), Simplexa™ COVID-19 Direct kit (DiaSorin Molecular LLC, Cypress, CA), and an in-house Real time PCR assay (Liverpool Clinical Laboratories, UK)).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detected 48 positive samples for SARS-CoV-2 out of a total of 148 tested samples while Simplexa™ COVID-19 Direct kit (DiaSorin Molecular LLC, Cypress, CA) detected 47 positive samples for SARS-CoV-2.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detected 52 positive samples for Influenza A out of a total of 167 analyzed samples, as well as Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test (Roche). On the other hand, Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detected 28 positive samples for Influenza A out of a total of 46 analyzed samples, as well as the in-house Real time PCR assay (Liverpool Clinical Laboratories, UK)).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B detected 16 positive samples for Influenza B out of a total of 167 analyzed samples as well as the Cobas® Influenza A/B & RSV Nucleic Acid test (Roche).

These results indicate high concordance for detecting SARS-CoV-2, Influenza A, and Influenza B using the molecular diagnostic Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B kit.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of RNA template of the different pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of 10 copies/rxn for SARS-CoV-2, 10 copies/rxn for Flu A and 40 copies/rxn for Flu B.

Analytical specificity

The analytical specificity for detection of SARS-CoV-2, Influenza A and Influenza B was tested within a panel composed of the most common respiratory pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species except for the target pathogens that each assay detects:

Cross-reactivity assay		
Human Parainfluenza 1, 2, 3 and 4	Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) Virus (clade 3C.3a)	Influenza A/chicken/Hong Kong/G9/1997 x PR8-IBCDC-2 (H9N2) Virus
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) Virus (clade 3C.2a)	Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) Virus
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) Virus	Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) Virus	Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 Virus
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) Virus	Influenza B/Brisbane/60/2008 Virus
Bocavirus	Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) Virus	Influenza B/Colorado/6/2017 Virus
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) Virus	Influenza B/Malaysia/2506/2004 Virus
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) Virus	Influenza B/Maryland/15/2016 Virus
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) Virus	Influenza B/Netherlands/207/06 Virus
Human Coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) Virus	Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) Virus
MERS Coronavirus	Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) Virus	Influenza B/Nevada/3/2011 Virus
SARS Coronavirus strain Frankfurt 1	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) Virus (Clade 3C2a.1)	Influenza B/New Jersey/1/2012 Virus
SARS-CoV-2 strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1	Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2) (NYMC X-175C) Virus	Influenza B/Texas/02/2013 Virus
SARS-CoV-2 strain 2019-nCoV/Italy-INMI1	Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) Virus	Influenza B/Townsville/8/2016 Virus
SARS-CoV-2 isolate Australia/VIC01/2020	Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) Virus	Influenza B/Canberra/11/2016 Virus
SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1	Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) Virus	Influenza B/Florida/4/2006 Virus
SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020	Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) Virus	Influenza B/Florida/07/2004 Virus
Enterovirus Echovirus 11 and 30	Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) Virus	Influenza B/Guangdong/120/2000 Virus

Enterovirus 68 and 71	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) Virus	Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) Virus
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) Virus	Influenza B/ Jiangsu/10/2003 Virus
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC- RG25a Virus	Influenza B/Massachusetts/2/2012 Virus
Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Virus	Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) Virus	Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) Virus
Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) Virus	Influenza B/Phuket/3073/2013 Virus
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) Virus	Influenza B/Texas/06/2011 Virus
Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) Virus	Influenza B/Wisconsin/1/2010 Virus
Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) Virus	Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A Virus
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Egypt/3300- NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC- RG13 (H5N1) Virus	<i>Legionella pneumophila</i>
Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 (clade 6B.1) Virus	Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 Virus	<i>Legionella dumoffii</i>
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) Virus	Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) Virus	<i>Legionella longbeachae</i>
Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 Virus	<i>Legionella micdadei</i>
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR- 180 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) Virus	<i>Legionella bozemanii</i>
Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) Virus	Human Rhinovirus type C
Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 Virus	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) Virus	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) Virus	Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG- 14) (H5N1) Virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) Virus	Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8- IBCDC-RG (H5N1) Virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant

Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) Virus	Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) Virus	Human Adenovirus Type 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
Influenza A/Hiroshima/52/2005 (IVR-142) (H3N2) Virus	Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 Virus	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652
Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) Virus	Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) Virus	Human metapneumovirus A and B
Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) Virus	Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) (Clade 2.3.4.4) Virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v Virus	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2013 (H5N8) Virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v Virus	Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) Virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) Virus	Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) Virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) Virus	Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 Virus	<i>Streptococcus salivarius</i>
Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) Virus	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) Virus	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B (strain CH93(18)-18)
Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v Virus	Influenza A/Guangdong/17SF00k3/2016 (H7N9) Virus	Respiratory syncytial virus strain Long
Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v Virus		

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B for SARS-CoV-2 was evaluated against RNA extracted from the strains: Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USAWA1/2020, and synthetic RNA controls for two variants of the SARS-CoV-2 virus: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) and MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), showing a positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B for Influenza A was evaluated against RNA extracted from the strains: Influenza A/PR/8/34 (H1N1) virus, Influenza A/Brisbane/02/2018, IVR-190 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Dominican Republic/7293/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Massachusetts/15/2013 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Netherlands/1250/2016 (H1N1)pdm09 virus (clade 6B.1), Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus,

Influenza A/New York/18/2009 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Singapore/GP1908/2015 virus, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Sydney/134/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Victoria/2040/2018 (H1N1)pdm09 virus, Influenza A/Brisbane/117/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Brisbane/1028/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Fujian/411/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Hiroshima//52/2005 (IVR-142) (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) virus, Influenza A/Hong Kong/4801/2014 NYMC X-263B (H3N2) virus, Influenza A/Indiana/8/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Indiana/10/2011 (H3N2)v virus, Influenza A/Kansas/14/2017 (H3N2) virus, Influenza A/Kansas/14/2017, NYMC X-327 (H3N2) virus, Influenza A/Kumamoto/102/2002 (H3N2) virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 (H3N2)v virus, Influenza A/Minnesota/11/2010 X203 (H3N2)v virus, Influenza A/Netherlands/398/2014 (H3N2) virus (clade 3C.3a), Influenza A/Netherlands/2393/2015 (H3N2) virus (clade 3C.2a), Influenza A/Newcastle/607/2019 (H3N2) virus, Influenza A/New York/39/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Ohio/2/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Perth/1001/2018 (H3N2) virus, Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014 (H3N2) virus, Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus, Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus, Influenza A/Texas/50/2012 (H3N2) virus, Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus (Clade 3C2a.1), Influenza A/Uruguay/716/2007 (H3N2)(NYMC X-175C) virus, Influenza A/Victoria/210/2009(H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 (H3N2) virus, Influenza A/Victoria/361/2011 IVR-165 (H3N2) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 (H5N1) virus, Influenza A/Anhui/01/2005 x PR8-IBCDC-RG6 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 x PR8-IDCDC-RG12 (H5N1) virus, Influenza A/chicken/Vietnam/NCVD-03/08 (H5N1) - PR8-IDCDC-RG25a virus, Influenza A/chicken/Yunnan/1251/2003 (H5N1) virus, Influenza A/common magpie/Hong Kong/645/2006 (H5N1) virus, Influenza A/duck/Hunan/795/2002 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/321/2007 x PR8-IDCDC-RG11 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/3300-NAMRU3/2008 x PR8-IDCDC-RG13 (H5N1) virus, Influenza A/Egypt/N03072/2010 (H5N1) x PR8-IDCDC-RG29 virus, Influenza A/Hong Kong/213/2003 (H5N1) virus, Influenza A/Hubei/1/2010 (H5N1) x PR8-IDCDCRG30 virus, Influenza A/India/NIV/2006 xPR8-IBCDC-RG7 (H5N1) virus, Influenza A/Japanese white eye/Hong Kong/1038/2006 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) virus, Influenza A/Vietnam/1203/2004 x PR8-IBCDC-RG (H5N1) virus, Influenza A/Whooper Swan/R65/2006 (H5N1) virus, Influenza A/pheasant/New Jersey/1355/1998 (H5N2)-PR8-IBCDC-4 virus, Influenza A/Duck/Singapore-Q/F119-3/97 (H5N3) virus, Influenza A/Duck/Lao/XBY004/2014 (H5N6) virus (Clade 2.3.4.4), Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus, Influenza A/turkey/Virginia/2002 x PR8-IBCDC-5 (H7N2) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/2/2009 (H7N7) virus, Influenza A/Mallard/Netherlands/12/2000 (H7N7) - IBCDC-1 virus, Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus, Influenza A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) virus, Influenza A/Chicken/Hong Kong/G9/1997 x

PR8-IBCDC-2 (H9N2) virus, Influenza A/Chicken/Myanmar/433/2016 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) virus, Influenza A/Hong Kong/33982/2009 (H9N2) x PR8-IDCDC-RG26 virus, showing a positive result.

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B for Influenza B was evaluated against RNA extracted from the strains: Influenza B/Brisbane/60/2008 virus, Influenza B/Colorado/6/2017 virus, Influenza B/Malaysia/2506/2004 virus, Influenza B/Maryland/15/2016 virus, Influenza B/Netherlands/207/06 virus, Influenza B/Netherlands/2518/2016 (clade 1A) virus, Influenza B/Nevada/3/2011 virus, Influenza B/New Jersey/1/2012 virus, Influenza B/Texas/02/2013 virus, Influenza B/Townsville/8/2016 virus (B/Victoria lineage); Influenza B/Canberra/11/2016 virus, Influenza B/Florida/4/2006 virus, Influenza B/Florida/07/2004 virus, Influenza B/Guangdong/120/2000 virus, Influenza B/Hubei Wujiagang/158/2009 (NYMC BX-39) virus, Influenza B/Jiangsu/10/2003 virus, Influenza B/Massachusetts/2/2012 virus, Influenza B/Netherlands/365/2016 (clade 3) virus, Influenza B/Phuket/3073/2013 virus, Influenza B/Texas/06/2011 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 virus, Influenza B/Wisconsin/1/2010 BX-41A virus (B/Yamagata lineage), showing a positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + Flu A + Flu B 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

I: For Rotor-Gene® Q thermocycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q 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, Influenza A and/or Influenza B infection. All results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.

- This assay was tried with nasopharyngeal and oropharyngeal smears. 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 SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B either by samples containing high concentrations of target RNA or by contamination due to PCR products from previous reactions.
- Due to the low number of human cells in the original clinical sample, some samples may not present RNase P amplification curves. A negative IC signal does not prevent the presence of SARS-CoV-2, Flu A and/or Flu B RNA in a clinical sample.
- Detection of these pathogens may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage and handling; b) procedural errors (including RNA isolation); c) RNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B genome covered by this test which may result in RNA being undetectable when pathogen load is below the limit of detection for the assay; e) the presence of retrotranscription and/or Real Time amplification inhibitors or other types of interference; f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of viral RNA may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that these pathogens are the causative agents for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimens' types for the identification of SARS-CoV-2 and the new strain of Influenza A and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.
- If the clinical data of the patient, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible SARS-CoV-2, Influenza A and/or Influenza B infection and other respiratory illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

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

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

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
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
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
MiIQ™ Real-Time PCR Detection System
MiIQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
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
DTiite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Wang H, Li X, Li T, et al. (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 39(9):1629-1635.
2. Ogimi C, Kim YJ, Martin ET, Huh HJ, Chiu CH, Englund JA. (2020). What's New With the Old Coronaviruses? *J Pediatric Infect Dis Soc*. 9(2):210-217.
3. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> Accessed September 2020.
4. World Health Organization. Coronavirus. https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1 Accessed September 2020.
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 395(10224):565-574.
6. Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., ... & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*.
7. Liu Z, Chu R, Gong L, Su B, Wu J. (2020). The assessment of transmission efficiency and latent infection period on asymptomatic carriers of SARS-CoV-2 infection [published online ahead of print, 2020 Jun 13]. *Int J Infect Dis*. S1201-9712(20)30471-9.
8. Kumar M, Taki K, Gahlot R, Sharma A, Dhargar K. (2020). A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I - Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci Total Environ*. 734:139278.
9. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*. 66(4):549-555.
10. Lv DF, Ying QM, Weng YS, et al. (2020). Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clin Chim Acta*. 506:172-175.
11. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed July 2020
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Transmission of COVID-19. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/transmission> Accessed September 2020
13. Sharma A, Tiwari S, Deb MK, Marty JL. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *Int J Antimicrob Agents*. 56(2):106054.

14. World Health Organization. Clinical management of COVID-19. Interim guidance 27 May 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed September 2020
15. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed September 2020
16. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Influenza (Flu). Available from: <https://www.cdc.gov/flu/index.htm> Accessed September 2020
17. World Health Organization. Influenza (Seasonal). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) Accessed September 2020
18. Wang R, Taubenberger JK. (2010). Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert review of anti-infective therapy*. 8(5):517-527.
19. Lakdawala SS, Lee N, Brooke CB. (2019). Teaching an Old Virus New Tricks: A Review on New Approaches to Study Age-Old Questions in Influenza Biology. *J Mol Biol*. 431(21):4247-4258.
20. Keilman LJ. (2019). Seasonal Influenza (Flu). *Nurs Clin North Am*. 54(2):227-243.

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.

Mastecycler™ 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
	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