

# Vitassay qPCR

## SARS-CoV-2 + UK Variant

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de SARS-CoV-2 y de la delección HV 69/70 del gen S para el SARS-CoV-2 en muestras respiratorias.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion of the S gene for SARS-CoV-2 in respiratory samples.



## Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant permite la detección cualitativa de SARS-CoV-2 y de la delección HV 69/70 del gen *S* para el SARS-CoV-2 asociada a la variante SARS-CoV-2 VOC-202012/01 (linaje B.1.1.7) y a otras variantes mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de frotis nasofaríngeos. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por SARS-CoV-2 y variantes portadoras de la delección HV 69/70.

## Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 4 x 8-well strip, low profile	7041055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 4 x 8-well strip, high profile	7042055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 96-well plate, low profile	7091055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 96-well plate, high profile	7092055

## Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041055 y 7042055:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S055/ 7042S055	SARS-CoV-2 + UK Variant strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C055	SARS-CoV-2 + UK Variant 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 7091055 y 7092055:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P055/ 7092P055	SARS-CoV-2 + UK Variant Plate	-	1 placa
7C055	SARS-CoV-2 + UK Variant Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	12 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación.

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

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR en tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C).
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

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

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

Las personas con COVID-19 han informado de una amplia gama de síntomas, que van desde síntomas leves hasta enfermedades graves. Los síntomas incluyen fiebre o escalofríos, tos, falta de aire o dificultad para respirar, fatiga, dolores musculares o corporales, dolor de cabeza, pérdida del gusto o del olfato, dolor de garganta, congestión o secreción nasal, náuseas o vómitos y diarrea. Los síntomas pueden aparecer de 2 a 14 días después de la exposición al virus. Las personas mayores y aquellas con problemas médicos subyacentes como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad grave y la infección puede progresar a neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda e insuficiencia multiorgánica. La tasa de mortalidad varía del 3% al 4%.

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

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

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

En los últimos meses han surgido varias variantes preocupantes del SARS-CoV-2 (VOC) y es fundamental vigilarlas en todos los países. El Reino Unido (UK) ha detectado una nueva variante de SARS-CoV-2 a partir de muestras tomadas inicialmente en Kent el 20 de septiembre y en Londres el 21 de septiembre de 2020, que se encontró asociada con una mayor transmisibilidad. Esta variante, denominada VOC-202012/01 (B.1.1.7) se define por múltiples cambios en la proteína *spike* (delección 69-70, delección 144, cambio de aminoácidos N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) así como por mutaciones en otras regiones genómicas. La delección en las posiciones 69 y 70 (del69-70) evolucionó espontáneamente en otras variantes del SARS-CoV-2 y se plantea la hipótesis de que aumenta la transmisibilidad. La delección en las posiciones 69 y 70 provoca el fallo de la diana del gen S (SGTF) en al menos un ensayo de diagnóstico

basado en RT-PCR. La delección *spike* 69-70 se ha descrito también en el contexto de la evasión de la respuesta inmune humana, pero también ha ocurrido varias veces en asociación con otros cambios de RBD (dominio de unión al receptor). Desde una perspectiva diagnóstica, la presencia de la delección 69/70 permite un cribado rápido de la variante B.1.1.7.

### Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *S* para la delección HV 69/70 y con dos regiones diana conservadas de los genes *ORF1ab* y *N* de SARS-CoV-2. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de SARS-CoV-2 se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' 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 + UK Variant 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 (CI) (gen *RNase P* presente en el DNA humano) que se espera que esté presente en todas las células humanas nucleadas. La amplificación de la secuencia diana del gen *S* (Delección HV 69/70) es detectada en el canal FAM, la amplificación de la secuencia diana del gen *ORF1ab* es detectada en el canal ROX, la amplificación de la secuencia diana del gen *N* es detectada en el canal Cy5 mientras que el control interno endógeno (CI) se detecta en el canal 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.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- 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.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNase/DNasa.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## **Procedimiento**

### **Toma de muestra, preparación y extracción de RNA**

Las muestras de pacientes deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de

PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Para muestras respiratorias los siguientes kits de extracción han sido validados:

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

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

### Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del SARS-CoV-2 + UK Variant 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:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (Delección HV 69/70), ROX (gen *ORF1ab*), Cy5 (gen N) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver adjunto II).

### **Análisis e interpretación de resultados**

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación y el procedimiento de extracción compruebe la emisión de señal de control interno endógeno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras 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 (Ct  $\leq$ 40) en los canales FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

#### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct  $\geq$ 40 o no señal) de FAM, ROX, Cy5 y HEX, VIC o JOE.

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

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

Una vez validado el resultado de los controles con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados de las muestras:



Gen S (Delección HV 69/70) (FAM)*	Gen ORF1ab (ROX)*	Gen N (Cy5)*	Control Interno Endógeno (HEX)	Interpretación	
+	+	+	+/-*	Válido	Delección HV 69/70 Detectado
-	+	+	+/-*	Válido	SARS-CoV-2 Detectado (Delección HV 69/70 no detectada)
-	-	+	+/-*	No concluyente	Si únicamente amplifica un gen diana de SARS-CoV-2, repita el ensayo en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada. Tras repetir la prueba una vez, si al menos un gen diana resulta positivo, la muestra debe considerarse positiva para SARS-CoV-2.
-	+	-	+/-*		
+	-	-	+/-*	No concluyente†	Si el gen diana S (Delección HV 69/70) amplifica, <u>independientemente de la amplificación de otras dianas</u> , repita el ensayo en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada. Tras repetir la prueba una vez, si al menos el gen S (Delección HV 69/70) resulta positivo, la muestra debe considerarse como delección HV 69/70 detectada.
+	+	-	+/-*		
+	-	+	+/-*		
-	-	-	+ <sup>#</sup>	Válido	RNA molde diana no Detectado <sup>#</sup>
-	-	-	- <sup>#</sup>	Inválido	Test fallido <sup>#</sup>

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

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

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

# En el caso de que la detección de las regiones diana de SARS-CoV-2 resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. El valor de Ct podría ser muy variable debido a que el Control interno endógeno es un gen humano housekeeping que debería estar presente en todas las células nucleadas humanas en la muestra original. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct  $\geq 35$  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 repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

† Una muestra que solo sea positiva para el gen S, puede considerarse como probable positiva para SARS CoV-2, probablemente debido a una baja carga viral de RNA cercana al límite de detección o a una eficiencia de amplificación diferente entre las dianas. Se recomienda volver a analizar la muestra para confirmar el resultado (consulte en detalle la columna Interpretación).

La presencia de la delección HV 69/70 está asociada con el linaje B.1.1.7 de la variante del Reino Unido, sin embargo, la asignación final a un linaje debe realizarse mediante secuenciación.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada):

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

## **Control de Calidad**

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

## **Características técnicas**

### **Sensibilidad y especificidad clínica**

La sensibilidad y la especificidad clínica de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant se evaluó utilizando muestras clínicas respiratorias (frotis nasofaríngeos) procedentes de pacientes con sospecha de infección respiratoria.

En los dos estudios realizados en hospitales locales de Madrid y Santander la extracción se realizó con el kit de extracción MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit utilizando el sistema de extracción automatizado KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) y el termociclador utilizado fue el Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

En ambos estudios los resultados obtenidos con Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant se compararon con el test TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay seguido de secuenciación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Hospital Local (Madrid)								
Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<b>Delección HV 69/70</b>	22	38	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)
<b>SARS-CoV-2 (No delección HV 69/70)</b>	18	42	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

Hospital Local (Santander)								
Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<b>Delección HV 69/70</b>	50	49	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)
<b>SARS-CoV-2 (No Delección HV 69/70)</b>	49	50	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar SARS-CoV-2 y la Delección HV 69/70 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant.

### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de SARS-CoV-2 ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 40 copias/rxn para el gen S (delección HV 69/70), 40 copias/rxn para gen *ORF1ab* y 80 copias/rxn para gen *N*.

## Especificidad analítica

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

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Metapneumovirus humano A y B
Virus respiratorio sincitial (VRS) A y B	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipo A y C	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> no resistente a rifampicina
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	Parainfluenza humano 1, 2, 3 y 4 virus
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 y HKU1	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS Coronavirus	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	Bocavirus humano
SARS Coronavirus Cepa Frankfurt 1	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	Rhinovirus humano tipo C
Enterovirus 68 y 71	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Enterovirus Echovirus 11 y 30	Influenza B/Florida/04/06 virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Adenovirus Tipo 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

## Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando RNA extraído a partir de los virus Human 2019-nCoV cepa BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV cepa 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 cepa 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER y controles de RNA sintético para cuatro variantes del virus SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020), MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), B.1.1.7\_710528 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14) y B.1.1.7\_601443 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15), mostrando un resultado positivo.

## Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>1</sup>
- 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)
- NEOS-96 qPCR (Linear Chemicals)

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

## Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por SARS-CoV-2. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo). 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.

- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con SARS-CoV-2, ya sea por el gran número de copias de cDNA molde que contiene cada vial SARS-CoV-2 + UK Variant Positive Control, muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección de los genes *ORF1ab* y *N* empleadas en el test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant, diseñado para la detección específica de SARS-CoV-2, no mostraron mayormente homologías combinadas significativas con el genoma humano, otros coronavirus o microflora humana que pudieran predecir posibles resultados falsos positivos de la reacción RT-qPCR (con la excepción de algunas secuencias del *N* y/o *ORF1ab* de SARS-CoV, y de otros coronavirus identificados en murciélago y pangolín).
- La detección del SARS-CoV-2 puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido 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 identificadas por este test que pueden provocar que el RNA sea indetectable e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la retrotranscripción y/o amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores relacionados con COVID-19); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante. En caso de duda, consulte la sección Análisis e interpretación de resultados para comprobar la interpretación correcta de los resultados.
- La detección del RNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que el SARS-CoV-2 sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- La presencia de la delección HV 69/70 está asociada con el linaje B.1.1.7 de la variante del Reino Unido, sin embargo, la asignación final a un linaje debe realizarse mediante secuenciación.
- Los resultados negativos no impiden la infección por el virus SARS-CoV-2 y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras para la identificación de SARS-CoV-2 y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere

la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.

- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con SARS-CoV-2, y se han descartado otras enfermedades respiratorias, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Algunas muestras pueden no presentar curvas de amplificación de *RNasa P* debido al bajo número de células humanas en la muestra clínica original. Una señal del CI negativa no impide la presencia de RNA del SARS-CoV-2 en una muestra clínica.

## 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>Bio Molecular Systems</b>
Mic Real Time PCR Cyclor
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Precision System Science Co., Ltd.</b>
geneLEAD VIII System
<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™ 2 Real-Time PCR Detection System
<b>Bio Molecular Systems</b>
Mic Real Time PCR Cyclor
<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>Precision System Science Co., Ltd.</b>
geneLEAD VIII System
<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	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Adjunto III: Configuración valores de exposición

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

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
<b>DTiite 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

\* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

## Intended use

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant allows the qualitative detection of SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion of the S gene for SARS-CoV-2 associated to the SARS-CoV-2 VOC-202012/01 (lineage B.1.1.7) variant and other variants by real-time RT-PCR in nasopharyngeal swabs. The product is intended for use in the diagnosis of SARS-CoV-2 and variants that carry the HV 69/70 deletion infections alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 4 x 8-well strip, low profile	7041055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 4 x 8-well strip, high profile	7042055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 96-well plate, low profile	7091055
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant 96-well plate, high profile	7092055

## Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041055 and 7042055:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S055/ 7042S055	SARS-CoV-2 + UK Variant strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C055	SARS-CoV-2 + UK Variant 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 7091055 and 7092055:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P055/ 7092P055	SARS-CoV-2 + UK Variant Plate	-	1 plate
7C055	SARS-CoV-2 + UK Variant Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	12 x 8 cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

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

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

People with COVID-19 have had a wide range of symptoms reported, ranging from mild symptoms to severe illness. Symptoms include fever or chills, cough, shortness of breath

or difficulty breathing, fatigue, muscle or body aches, headache, loss of taste or smell, sore throat, congestion or runny nose, nausea or vomiting and diarrhea. Symptoms may appear 2-14 days after exposure to the virus. Older people, and those with underlying medical problems like cardiovascular disease, diabetes, chronic respiratory disease, and cancer are more likely to develop serious illness and infection may progress to pneumonia, acute respiratory distress syndrome and multi-organ failure. The fatality rate ranges from 3% to 4%.

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

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

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

Several SARS-CoV-2 variants of concern (VOC) have emerged in the past months and monitoring them in all countries is key. The United Kingdom (UK) has detected a new variant of SARS-CoV-2 from samples initially taken in Kent on September 20<sup>th</sup> and London on September 21<sup>st</sup>, 2020, which was found associated with increased transmissibility. This variant, called VOC202012/01 (B.1.1.7) is defined by multiple spike protein changes (deletion 69-70, deletion 144, amino acid change N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) as well as by mutations in other genomic regions. The deletion at positions 69 and 70 (del69–70) evolved spontaneously in other SARS-CoV-2 variants and is hypothesized to increase transmissibility. The deletion at positions 69 and 70 causes S-gene target failure (SGTF) in at least one RT-PCR–based diagnostic assay. The spike deletion 69-70 has been also described in the context of evasion to the human immune response but has also occurred a number of times in association with other RBD (receptor-binding domain) changes. From a diagnostic perspective, the presence of the 69/70 deletion allows a rapid screening of the B.1.1.7 variant.

## Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant is based on the real-time amplification of a conserved region of the *S* gene for SARS-CoV-2 HV 69/70 deletion and a conserved region of the *ORF1ab* and *N* genes for SARS-CoV-2. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The SARS-CoV-2 presence 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 + UK Variant is a ready-to use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an endogenous internal control allows the extraction process control and the detection of a possible inhibition reaction. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous internal control (IC) (*RNase P* gene present in human DNA) that is expected to be present in all nucleated human cells. The amplification of the target sequence *S* gene (HV 69/70 deletion) is detected through the FAM channel, the amplification of the target sequence *ORF1ab* gene is detected through the ROX channel, the amplification of the target sequence *N* gene is detected through the Cy5 channel whereas the endogenous internal control (IC) 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.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- 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.

- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing, and RNA extraction**

Patient samples must be collected, transport and storage according to appropriate laboratory guidelines. For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For respiratory samples, the assay has been validated with the following extraction kits:

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

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

## Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 + UK Variant Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots 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*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (HV 69/70 deletion), ROX (*ORF1ab* gene), Cy5 (*N* gene) and HEX, JOE, or VIC channels (Endogenous Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (attached II).



## **Analysis and interpretation of results**

The results' analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, and the extraction procedure, check the endogenous internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of 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 intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

### **Positive control**

The positive control used in each run must show an amplification curve for SARS-CoV-2 (Ct  $\leq$ 40) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

### **Negative control**

The negative control included in each run must show signal' absence for SARS-CoV-2 (Ct  $\geq$ 40 or no signal) in FAM, ROX, Cy5 and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

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

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal' absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

S gene (HV 69/70 deletion) (FAM)*	ORF1ab gene (ROX)*	N gene (Cy5)*	Endogenous Internal Control (HEX)	Interpretation	
+	+	+	+/-*	Valid	HV 69/70 deletion Detected
-	+	+	+/-*	Valid	SARS-CoV-2 Detected (HV 69/70 deletion not detected)
-	-	+	+/-*	Inconclusive	<p>If only one SARS-CoV-2 target gene amplifies, repeat test depending on the available material:</p> <p>a) obtain a new specimen, re-extract, and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample.</p> <p>After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered SARS-CoV-2 positive.</p>
-	+	-	+/-*		
+	-	-	+/-*	Inconclusive <sup>†</sup>	<p>If S gene (HV 69/70 deletion) target gene amplifies, <u>regardless of the amplification of other targets</u>, repeat test depending on the available material:</p> <p>a) obtain a new specimen, re-extract, and retest (ideally) or, b) re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, c) repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample.</p> <p>After retesting one time, if S gene (HV 69/70 deletion) is positive, the sample should be considered HV 69/70 deletion detected.</p>
+	+	-	+/-*		
+	-	+	+/-*		
-	-	-	+ <sup>#</sup>	Valid	Targets Not detected <sup>#</sup>
-	-	-	- <sup>#</sup>	Invalid	Test failed <sup>#</sup>

**(+) Positive:** Amplification signal

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

\* Sometimes, the Endogenous Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids.

<sup>#</sup> In the case of negative SARS-CoV-2 target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. The Ct value could be very variable due to the Endogenous Internal Control

is a human *housekeeping* gene that should be present in all human nucleated cells in the original sample. If there is a signal' absence or Ct value  $\geq 35$  of Endogenous Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR by diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

† A sample only positive for the S gene target, can be considered as probable positive for SARS CoV-2, probably due to a low RNA load near the detection limit or to a different amplification efficiency between the targets. It is recommended to retest the sample to confirm the result (Consult Interpretation column in detail).

The presence of the HV 69/70 deletion is associated with the UK variant, lineage B.1.1.7, however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

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

## **Quality Control**

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

## **Performance evaluation**

### **Clinical sensitivity and specificity**

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant was evaluated using respiratory clinical specimens (nasopharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection.

In the two studies carried out in local hospitals in Madrid and Santander, the extraction was carried out with the extraction kit MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) and the thermocycler used was Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

In both studies, the results obtained with Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant were compared with the TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay followed by sequencing. The results obtained were the following:

Local Hospital (Madrid)								
Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<b>HV 69/70 deletion</b>	22	38	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)
<b>SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)</b>	18	42	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

Local Hospital (Santander)								
Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<b>HV 69/70 deletion</b>	50	49	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)
<b>SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)</b>	49	50	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)

These results show high agreement to detect SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of SARS-CoV-2 template ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of 40 genome copies/rxn for S gene (HV 69/70 deletion), 40 genome copies/rxn for *ORF1ab* gene and 80 genome copies/rxn for N gene.

### Analytical specificity

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

SARS-CoV-2		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	Human metapneumovirus A and B
Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS Coronavirus	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	Human Bocavirus
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	Human rhinovirus type C
Enterovirus 68 and 71	Influenza B/Brisbane/60/2008	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Enterovirus Echovirus 11 and 30	Influenza B/Florida/04/06 virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

## Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant was confirmed by real-time amplification using RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020\_IsolatBER, SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020, SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020\_IsolatBER and synthetic RNA controls for four SARS-CoV-2 virus variants: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020),

MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), B.1.1.7\_710528 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 14) and B.1.1.7\_601443 (Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 15), showing positive result.

### **Compatibles real-time PCR equipment**

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>1</sup>
- 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)
- NEOS-96 qPCR (Linear Chemicals).

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

### **Limitations**

- This test provides a presumptive diagnosis of SARS-CoV-2 infection. All results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with respiratory samples (nasopharyngeal swabs). The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; RNA from clinical specimens must be extracted properly.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either high number of cDNA template copies which contains each SARS-CoV-2 + UK Variant Positive Control vial, samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combinations for the *ORF1ab* and *N* genes detection used in Vitassay qPCR SARS-CoV-2 + UK Variant, designed for the specific SARS-CoV-2 detection, do not show significant combined homologies with the human genome, other coronaviruses, or human microflora that would predict potential false positive RT-qPCR results (except for some *N* and/or

*ORF1ab* sequences from SARS-CoV, and other coronaviruses identified in bats and pangolin).

- Detection of SARS-CoV-2 may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including RNA isolation); c) RNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the SARS-CoV-2 genome covered by this test which may result in RNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of retrotranscription and/or Real Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs related to COVID-19 was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures. If in doubt, refer to section Analysis and interpretation of results to check the correct interpretation of the results.
- Detection of viral RNA may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that SARS-CoV-2 is the causative agent for clinical symptoms.
- The HV 69/70 deletion presence is associated with the UK variant, lineage B.1.1.7, however, final assignment to a lineage must be done by sequencing.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 virus infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Specimens' types for the SARS-CoV-2 identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible SARS-CoV-2 infection, and other respiratory illnesses have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell number in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the SARS-CoV-2 RNA presence in a clinical specimen.

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

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

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

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	Color Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Color Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
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
<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

\*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

## Bibliography/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 March 2021.
4. World Health Organization. Coronavirus. [https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1) Accessed March 2021.
5. Lu R, Zhao X, Li J, et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 395(10224):565-574.
6. Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., ... & Hoelscher, M. (2020). Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*.
7. Liu Z, Chu R, Gong L, Su B, Wu J. (2020). The assessment of transmission efficiency and latent infection period on asymptomatic carriers of SARS-CoV-2 infection [published online ahead of print, 2020 Jun 13]. *Int J Infect Dis*. S1201-9712(20)30471-9.
8. Kumar M, Taki K, Gahlot R, Sharma A, Dhangar K. (2020). A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I - Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci Total Environ*. 734:139278.
9. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, et al. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*. 66(4):549-555.
10. Lv DF, Ying QM, Weng YS, et al. (2020). Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clin Chim Acta*. 506:172-175.
11. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed March 2021
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 March 2021
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 March 2021
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 March 2021
16. To KK, Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, et al. (2020) Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. Clin Infect Dis. 71(15):841-843.
17. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, Huang Z, Li X, Deng K, Lin B, Gao Z. (2020) SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. J Med Virol. 92(9):1676-1680.
18. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Older Adults. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html> Accessed March 2021.
19. Du Z, Wang L, Yang B, Ali ST, Tsang TK, Shan S, Wu P, Lau EHY, Cowling BJ, Meyers LA. (2021) International risk of the new variant COVID-19 importations originating in the United Kingdom. medRxiv [Preprint]. Jan 15:2021.01.09.21249384.
20. Buenestado-Serrano S, Recio R, Sola Campoy PJ, et al. (2021) First confirmation of importation and transmission in Spain of the newly identified SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant. Enferm Infecc Microbiol Clin. Feb 19:S0213-005X(21)00046-X.
21. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. (2020) Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Virological.org. Available from: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563> Accessed March 2021
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. March 2021. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/methods-detection-and-identification-sars-cov-2-variants> Accessed March 2021
23. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 - increased circulation of variants of concern and vaccine rollout in the EU/EEA, 14th update. 15 February 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-risk-assessment-variants-vaccine-fourteenth-update-february-2021> Accessed March 2021

24. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, et al. (2021) Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70:95–99

## Trademarks

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










COBAS® are registered trademark of Roche.

AriaMx are trademarks of Agilent Technologies.

MagMAX™ and KingFisher™ are trademarks property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

MagDEA® Dx and magLEAD® are registered trademark of PSS.

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

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





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

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)