

Vitassay qPCR

SARS-CoV-2 Variants III

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de RNA de mutaciones genéticas en el gen S (Q954H) y en el gen *ORF1ab* (A2710T) en muestras respiratorias positivas para SARS-CoV-2.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of RNA from genetic mutations in the S gene (Q954H) and in the *ORF1ab* gene (A2710T) from positive SARS-CoV-2 respiratory samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III permite la detección cualitativa de RNA de mutaciones genéticas en el gen S (Q954H) y en el gen *ORF1ab* (A2710T) mediante RT-PCR en tiempo real en muestras nasofaríngeas positivas para SARS-CoV-2. El uso previsto de la prueba es ayudar en la monitorización de la prevalencia de mutaciones genéticas en el gen S (Q954H) y en el gen *ORF1ab* (A2710T) y el apoyo de medidas de control.

Referencias

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 4x8-well strip, low profile	7041061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 4x8-well strip, high profile	7042061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 96-well plate, low profile	7091061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 96-well plate, high profile	7092061

Materiales/Reactivos suministrados

Reactivos suministrados para las referencias 7041061 y 7042061:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S061/ 7042S061	SARS-CoV-2 Variants III strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C061	SARS-CoV-2 Variants III 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 7091061 y 7092061:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7091P061/ 7092P061	SARS-CoV-2 Variants III Plate low/high profile	-	1 placa
7C061	SARS-CoV-2 Variants III 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 a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o \leq -70°C).
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μ L, 20-200 μ L)
- 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).

A pesar de la lenta tasa de evolución del SARS-CoV-2 en relación con otros virus de ARN, su transmisión masiva y rápida durante la pandemia de COVID-19 le ha permitido adquirir una diversidad genética significativa desde que ingresó por primera vez a la población humana. Esto condujo a la aparición de numerosas variantes, algunas de las cuales recientemente se han etiquetado como "variantes de preocupación" (VOC), debido a su impacto potencial en la transmisión, morbilidad / mortalidad y la evasión de la neutralización por anticuerpos provocados por infección, vacunación o aplicación terapéutica. Sin embargo, la importancia de las variantes (clasificación como "variantes de interés" (VOI) o "variantes de preocupación" (VOC)) puede diferir según la ubicación.

A diciembre de 2021, un total de 22 estados pertenecientes a los EEUU habían identificado casos de la enfermedad conocida como Coronavirus debida a una nueva variante recientemente reconocida, el linaje B.1.1.529, denominada Ómicron, detectada por primera vez en noviembre de 2021 en Sudáfrica. Los síntomas más comúnmente notificados fueron tos, fatiga y congestión o secreción nasal. Muchos de los primeros casos notificados de infección por esta variante parecen ser leves, sin embargo, su alta transmisibilidad podría producir un colapso en los sistemas de salud.

La variante emergente B.1.1.529 u Ómicron está asociado con un mayor riesgo de la transmisibilidad en comparación con el virus SARS-CoV-2 original y está reconocido internacionalmente como VOC. B.1.1.529 y se caracteriza por ser la variante con más cambios en la proteína *spike* y poseer al menos 30 mutaciones de aminoácidos, tres deleciones pequeñas y una pequeña inserción. En concreto, 15 de las 30 sustituciones de aminoácidos se encuentran en el dominio de unión al receptor (RBD) de *spike*. Además, posee varios cambios y deleciones en otras regiones genómicas que desempeñan funciones clave en la unión de ACE2 (N501Y y Q498R) y en el reconocimiento de anticuerpos. Entre las diversas mutaciones encontradas en la proteína "Spike" y otras regiones genómicas se encuentran la Q954H (en el gen S) y la A2710T (en el gen *ORF1ab*).

Principio del test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen S (Q954H) y del gen *ORF1ab* (A2710T) del SARS-CoV-2. Tras la extracción de RNA, 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 hidrolisis 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 Variants III se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. 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. Tras la reacción de amplificación la mutación Q954H se detecta

en el canal HEX, la mutación A2710T se detecta en el canal FAM y el control interno endógeno (CI) se detecta en el canal ROX.

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 RNasa/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. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

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

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:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (A2710T), HEX (Q954H) y ROX (Control interno endógeno (CI)). Para comprobar los canales de detección más comunes según el equipo utilizado, consulte el 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), 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 ($C_t \leq 40$) en los canales FAM, ROX, y HEX.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($C_t > 40$ o no señal) de FAM, ROX, y HEX.

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:

A2710T (FAM)	Q954H (HEX)	Control interno endógeno (ROX)	Interpretación	
+	-	+/-*	Válido	Mutación A2710T detectada
-	+	+/-*	Válido	Mutación Q954H detectada
+	+	+/-*	Válido	Mutaciones A2710T y Q954H detectadas
-	-	+ [#]	Válido	RNA molde diana no Detectado [#]
-	-	- [#]	Inválido	Test fallido [#]

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct ≥40 o no señal)

* 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. El control interno endógeno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

En el caso de que la detección de las regiones diana de SARS-CoV-2 resulte negativa, el CI endógeno debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤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 >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.

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 Variants III se evaluó utilizando muestras clínicas respiratorias (hisopos nasofaríngeos) de pacientes con sospecha de infección respiratoria.

En el estudio realizado se analizaron un total de 181 muestras clínicas nasofaríngeas de pacientes con signos y síntomas clínicos o sospecha de enfermedad por COVID-19. En este estudio la extracción se realizó con el kit MagDEA Dx SV kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC y con el kit MagMAX™ Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation utilizando el instrumento KingFisher™ Flex system, y el termociclador utilizado fue el NEOS-96 Real Time PCR System (Linear).

En este estudio los resultados obtenidos con Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III se compararon con los valores obtenidos por WGS. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
A2710T (ORF1ab gen)	39	142	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)
Q954H (S gen)	39	142	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)

TP = Verdaderos positivos, TN = Verdaderos negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor predictivo positivo, NPV = Valor predictivo negativo. El diagnóstico inicial de las muestras y la caracterización de las muestras negativas se llevó a cabo con diferentes ensayos moleculares, además de secuenciación.

Estos resultados muestran una alta concordancia para detectar las mutaciones A2710T (*ORF1ab* gen) y Q954H (*S* gen) en muestras clínicas previamente caracterizadas como positivas para SARS-CoV-2 utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de las mutaciones A2710T y Q954H (10^7 - 10^1 copias/reacción).

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III tiene un límite de detección (LoD) de ≥ 100 copias genómicas por reacción para la mutación A2710T (*ORF1ab* gen) y de ≥ 12.5 copias genómicas por reacción para la mutación Q954H (*S* gen) con una tasa de positividad del 95%.

Especificidad analítica

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

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
Human rhinovirus type C	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008	Human Bocavirus

<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza B/Florida/04/06 virus	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	<i>Legionella bozemanii</i>	Human 2019-nCoV strain 2019- nCoV/Italy-INMI1
MERS Coronavirus	<i>Legionella dumoffii</i>	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA- WA1/2020
Enterovirus 68 and 71	<i>Legionella longbeachae</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_Isol atBER
Enterovirus Echovirus 30	<i>Legionella micdadei</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	<i>Legionella pneumophila</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden- Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_Is olatBER
<i>Haemophilus influenzae</i> <i>MinnA</i>	Human metapneumovirus A and B	MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020)
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)
Influenza A/California/7/2009(H1N1)p dm09	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 and SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 lineages (Alpha Variant)
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	SARS-CoV-2 B.1.351 lineage (Beta Variant)
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	SARS-CoV-2 P.1 lineage (Gamma Variant)
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	SARS-CoV-2 B.1.617.1 lineage (Delta Variant)

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III se evaluó frente a la siguiente cepa SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron variant), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- 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 Cyclers (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

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

- La prueba es para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- Este ensayo ha sido probado en muestras respiratorias (hisopo nasofaríngeo). El uso de otras muestras no se ha establecido. Se recomienda utilizar muestras iniciales caracterizadas como positivas para SARS-CoV-2 por un ensayo RT-qPCR que presenten valores de Ct menores o iguales a 30.
- 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.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- 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 resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con SARS-CoV-2, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección 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 utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); 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 mutación A2710T en el gen *ORF1ab* y la mutación Q954H en el gen *S*, se detectaron por primera vez en el siguiente linaje: B.1.1.529, sin embargo, la asignación final a un linaje debe realizarse mediante secuenciación.
- 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 óptimos 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.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- 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 endógeno negativa no impide la presencia de RNA de 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
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
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
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™ 2 Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
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	
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
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

* 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 Variants III allows the qualitative detection of RNA from genetic mutations in the *S* gene (Q954H) and in the *ORF1ab* gene (A2710T) by real-time RT-PCR in positive SARS-CoV-2 nasopharyngeal samples. The test is intended for use in the monitoring of the prevalence of genetic mutations in the *S* gene (Q954H) and in the *ORF1ab* gene (A2710T) and to support control measures.

References

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 4x8-well strip, low profile	7041061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 4x8-well strip, high profile	7042061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 96-well plate, low profile	7091061
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 96-well plate, high profile	7092061

Materials/reagents provided

Reagents provided in references 7041061 and 7042061:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S061/ 7042S061	SARS-CoV-2 Variants III strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C061	SARS-CoV-2 Variants III 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 7091061 and 7092061:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7091P061/ 7092P061	SARS-CoV-2 Variants III Plate low/high profile	-	1 plate
7C061	SARS-CoV-2 Variants III 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).

Despite the slow evolutionary rate of SARS-CoV-2 relative to other RNA viruses, its massive and rapid transmission during the COVID-19 pandemic has enabled it to acquire significant genetic diversity since it first entered the human population. This led to the emergence of numerous variants, some of them recently being labeled “variants of concern” (VOC), due to their potential impact on transmission, morbidity/mortality, and the evasion of neutralization by antibodies elicited by infection, vaccination, or therapeutic application. However, the importance of variants (classification as variants of interest (VOI) or variants of concern (VOC)) may differ by location.

As of December 2021, a total of 22 EEUU states reported cases of Coronavirus caused by a newly recognized variant, the lineage B.1.1.529 called Omicron, which was first detected in November 2021 in South Africa. The more common range of symptoms reported include cough, fatigue and congestion or difficulty breathing. Many of the first reported cases of infection with this variant appear to be mild, however, its high transmissibility could lead to a collapse in health systems.

The emerging variant B.1.1.529 or Omicron is associated with greater transmissibility risk compared with the original SARS-CoV-2 variant and is internationally recognized as VOC. B.1.1.529 is characterized as the variant with the most changes in the spike protein and has at least 30 amino acid mutations, three small deletions and one small insertion. In particular, 15 of the 30 amino acid substitutions are in the spike receptor binding domain (RBD). In addition, it has several changes and deletions in other genomic regions that play key roles in ACE2 binding (N501Y and Q498R) and antibody recognition. Among the mutations found in the “Spike” protein and other genomic regions are Q954H (in the S gene) and A2710T (in the *ORF1ab* gene).

Principle of the test

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III is based on the real-time amplification of a conserved region of SARS-CoV-2 S gene (Q954H) and SARS-CoV-2 *ORF1ab* gene (A2710T). After RNA extraction, the SARS-CoV-2 presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III 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. After the amplification reaction, the Q954H mutation is detected in the HEX channel, the A2710T mutation is detected in the FAM channel and the Endogenous Internal control (IC) is detected on channel ROX.

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 test functionality.
- 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. Follow the manufacturer's instructions for use. 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 Variants III 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 to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

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

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 into 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 channels FAM (A2710T), HEX (Q954H), and ROX (Endogenous Internal Control (IC)). To check the most common detection channels according to the equipment used, see 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 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 ($C_t \leq 40$) in FAM, ROX, and HEX channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($C_t > 40$ or no signal) in FAM, ROX, and HEX, which validates the reaction.

The positive 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:

A2710T (FAM)	Q954H (HEX)	Endogenous Internal Control (ROX)	Interpretation	
+	-	+/-*	Valid	Mutation A2710T detected
-	+	+/-*	Valid	Mutation Q954H detected
+	+	+/-*	Valid	Mutations A2710T y Q954H detected
-	-	+ [#]	Valid	Targets not Detected [#]
-	-	- [#]	Invalid	Test failed [#]

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct ≥40 or no 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. The Endogenous Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

[#] In the case of negative SARS-CoV-2 target genes detection, Endogenous IC must show an amplification signal with Ct ≤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 >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.

The 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 Variants III was evaluated using respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection.

In the carried-out study, a total of 181 nasopharyngeal clinical samples of patients with clinical signs and symptoms or suspicion of COVID-19 disease were analysed. In this study, extraction was performed with the MagDEA Dx SV kit using the magLEAD® 12gC instrument and with the MagMAX™ Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation kit using the KingFisher™ Flex system instrument, and the thermal cycler used was NEOS-96 Real Time PCR System (Linear).

The results obtained in this study with Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III were compared with the values obtained by WGS. The obtained results are shown in the following table:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
A2710T (<i>ORF1ab</i> gene)	39	142	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)
Q954H (S gene)	39	142	0	0	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)	1 (0.91-1)	1 (0.97-1)

TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value. The initial diagnosis of the samples and the characterization of the negative samples was carried out with different molecular assays, in addition to sequencing.

These results show high agreement to detect A2710T (*ORF1ab* gene) y Q954H (S gene) mutations in samples previously characterized as SARS-CoV-2 positive using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of A2710T and Q954H mutations standards ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction.

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III has a detection limit (LoD) of ≥ 100 genome copies/reaction for A2710T mutation (*ORF1ab* gene) and ≥ 12.5 genome copies/reaction for Q954H mutation (S gene) with a positivity rate of 95%.

Analytical specificity

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

Cross-reactivity assay		
Human rhinovirus type C	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41
Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Chlamydia caviae</i>	Influenza B/Brisbane/60/2008	Human Bocavirus
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	Influenza B/Florida/04/06 virus	SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> CM-1	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	<i>Legionella bozemanii</i>	Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1
MERS Coronavirus	<i>Legionella dumoffii</i>	SARS-CoV-2 strain 2019nCoV/USA-WA1/2020
Enterovirus 68 and 71	<i>Legionella longbeachae</i>	SARS-CoV-2

		BetaCoV/Berlin/ChVir1670/2020_IsolatBER
Enterovirus Echovirus 30	<i>Legionella micdadei</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/ChVir984/2020
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	<i>Legionella pneumophila</i>	SARS-CoV-2 BetaCoV/Baden-Wuerttemberg/1/ChVir1577/2020_IsolatBER
<i>Haemophilus influenzae MinnA</i>	Human metapneumovirus A and B	MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020)
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	<i>Moraxella catarrhalis</i>	MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1)
Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	SARS-CoV-2 B.1.1.7_710528 and SARS-CoV-2 B.1.1.7_601443 lineages (Alpha Variant)
Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	SARS-CoV-2 B.1.351 lineage (Beta Variant)
Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	SARS-CoV-2 P.1 lineage (Gamma Variant)
Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	SARS-CoV-2 B.1.617.1 lineage (Delta Variant)

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III was evaluated against the following strain SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron variant), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR SARS-CoV-2 Variants III has been validated on the following equipment:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 Instrument (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

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

Limitations

- The test is for professional *in vitro* diagnostic use.
- This assay was tried with respiratory samples (nasopharyngeal swabs). The use of other samples has not been established. It is recommended to use initial samples characterized as positive for SARS-CoV-2 by an RT-qPCR assay that present Ct values less than or equal to 30.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 positives results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either by samples containing high concentrations of target template RNA or by carryover contamination from PCR products from previous reactions.
- Detection 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 used to prevent the infection or used during the treatment of the infection 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 presence of the A2710T mutation in the *ORF1ab* gene and the Q954H mutation in the S gene has been first detected in the following lineage: B.1.1.529, 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. Optimal specimen types 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.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.
- Some samples may fail to exhibit *RNase P* amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative endogenous IC signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA 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
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
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
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
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cyclor
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
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:

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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*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 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. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html> Accessed Jan 2022.
20. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). SARS-CoV-2 Omicron Variant What You Need to Know. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/omicron-variant.html> Accessed Jan 2022
21. CDC COVID-19 Response Team (2021). SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant - United States, December 1-8, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(50), 1731–1734. Available from: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7050e1> Accessed Jan 2022
22. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Science Brief: Omicron (B.1.1.529) Variant. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-omicron-variant.html> Accessed Jan 2022
23. Outbreak.info. Lineage/Mutation Tracker – Omicron Variant Report. Available from: <https://outbreak.info/situation-reports/omicron>. Accessed Jan 2022.
24. He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. (2021) SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm.* 2:838-845.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

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

	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