

**VIASURE**

Real Time PCR Detection Kit



**SARS-CoV-2 & UK Variant  
(S UK, ORF1ab and N genes)**

---

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

**OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)**

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-SUK206L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-SUK206H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-SUK212L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-SUK212H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-SUK213L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-SUK213H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-SUK201L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-SUK201H

Table A 1. References for Open format with internal control products. / Referencias para productos Open Format con control interno.

**TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)**

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-SUK296T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

## Content

1.	Intended use.....	5
2.	Summary and Explanation .....	5
3.	Principle of the procedure .....	6
4.	Reagents provided .....	7
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user .....	7
6.	Transport and storage conditions.....	8
7.	Precautions for users .....	8
8.	Test procedure.....	9
9.	Result interpretation .....	10
10.	Limitations of the test .....	13
11.	Quality control .....	14
12.	Performance characteristics.....	15
	ANNEX 1 .....	18
A1.1	Principle of the procedure .....	18
A1.2	Reagents provided.....	18
A1.3	Test procedure .....	19
	ANNEX 2 .....	21
A2.1	Principle of the procedure .....	21
A2.2	Reagents provided.....	21
A2.3	Test procedure .....	22

## Contenido

1.	Uso previsto .....	24
2.	Introducción y explicación .....	24
3.	Procedimiento .....	25
4.	Reactivos suministrados .....	26
5.	Material requerido y no suministrado.....	26
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento .....	27
7.	Precauciones para el usuario .....	27
8.	Procedimiento del test.....	29
9.	Interpretación de resultados.....	30
10.	Limitaciones del test.....	32
11.	Control de calidad.....	34

---

12. Características del test .....	34
ANEXO 1 .....	37
A1.1 Procedimiento.....	37
A1.2 Reactivos suministrados .....	37
A1.3 Procedimiento del test.....	38
ANEXO 2 .....	40
A2.1 Procedimiento.....	40
A2.2 Reactivos suministrados .....	40
A2.3 Procedimiento del test.....	41
Bibliography/Bibliografía .....	43
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	44
Trademarks.....	44

## **ENGLISH**

### **1. Intended use**

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit is a real-time RT-PCR test designed for the qualitative detection of RNA from the SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion of the *S* gene for SARS-CoV-2 associated to the SARS-CoV-2 VOC202012/01 (lineage B.1.1.7) variant and other variants in nasopharyngeal swabs from individuals suspected of COVID-19 infection by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of SARS-CoV-2 as well as variants that carry the HV 69/70 deletion in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from respiratory specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2 and HV 69/70 deletion.

### **2. Summary and Explanation**

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to Coronaviridae family. There are six coronavirus species known to cause human diseases. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV.

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2.

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death. Center of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever, cough, myalgia and dyspnea. Less common symptoms are sore throat, headache, diarrhea and vomiting. It seems that people above 60 years old, males, and people with comorbidities most often have severe disease.

Diagnosis of SARS-CoV-2 is performed detecting conventional causes of pneumonia early and detected by next-generation sequencing or real-time RT-PCR methods. Several assays that detect the SARS-CoV-2 have been available, such as China CDC (gene targets, *ORF1ab* and *N*), Charité – Germany (gene targets, *RdRP* and *E*) or US CDC (two targets in *N* gene).

CDC recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal (NP) swab, oropharyngeal (OP) swabs, nasal mid-turbinate swab, nasal swab, nasopharyngeal wash/aspirate or nasal wash/aspirate (NW) and saliva specimens collected mainly by a healthcare professional) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage in patients with more severe respiratory disease) for the

---

identification of SARS-CoV-2. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus.

Since the initial genomic characterization of SARS-CoV-2, the virus has been divided into different genetic groups or clusters (S, L, V, G with GH and GR subgroups). The appearance of mutations is a natural and expected event within the evolution process of the virus. In fact, some specific mutations define the viral genetic groups that are currently circulating globally. The mutations identified to date remain within the expected patterns for a coronavirus. Viruses classified in genetic group G are the most frequent worldwide. Thanks to the genetic sequencing of the pathogen worldwide, it has been possible to establish patterns of dispersal and evolution of the virus.

On December 14, 2020, the United Kingdom declared an increase in the incidence of SARS-CoV-2 in some regions of its country associated with a new variant of the virus with a supposed greater transmission capacity. This variant, called VOC202012/01 (B.1.1.7) presented 23 different mutations: 13 non-synonymous, including a series of mutations in the spike protein (S), 4 deletions and 6 synonymous. By the end of December, this variant had been detected in 31 countries and territories in 5 of the 6 WHO regions. One of the mutations is the deletion at positions 69-70 in the spike protein. Detection of the HV 69/70 deletion is of great importance since it has been related to immune leakage in immunosuppressed patients and to increased viral infectivity. Another cause for concern in relation to the HV 69/70 deletion is that it affects the sensitivity of virus detection using molecular techniques (RT-PCR) that detects the S gene.

The presence of the HV 69/70 deletion is associated with the UK variant, lineage B.1.1.7, however, other variants such as B.1.1.298 (Danish lineage) or B.1.258 also have this deletion.

The appearance of variants that increase the transmissibility of the virus, its virulence or that escape the action of the neutralizing antibodies generated after natural infection or the vaccine, constitute a first-order public health problem that can have an important impact on control of the pandemic. A concern regarding the new variants is that their detection by molecular techniques (RT-PCR) could be affected. For this reason, most commercial PCR tests use multiple targets located on different SARS-CoV-2 genes, so the likelihood that new variants will not be detected decreased.

### 3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection of RNA from the SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion of the S gene for SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of the S gene for SARS-CoV-2 HV 69/70 deletion and by the amplification of a conserved region of the ORF1ab and N genes for SARS-CoV-2 using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an

increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an **endogenous internal control** to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an **endogenous Internal Control (IC)** (human RNase P gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

## 4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format with internal control products and Annex 2 for tube format with internal control products.

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).
- RNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer and NEOS-96 qPCR (Linear Chemicals). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website [www.certest.es](http://www.certest.es).

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500\*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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

## 6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

## 7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-SUK213L, and VS-SUK213H). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.

- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents at all times. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" does not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment because it does not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP) or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

## 8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open format with internal control products Test Procedure and Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure.

### 8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Real Time PCR Detection kit has been validated on nasopharyngeal specimens collected with synthetic fiber swabs with plastic and placed immediately into a sterile transport tube containing Universal transport medium (UTM). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 72 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 72 hours), It is recommended shipping at -20°C or lower. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can

be stored at 2 to 8°C for up to 72 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The respiratory specimens must be collected, transport and storage according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf>) and Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

## 8.2. RNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For RNA extraction from respiratory samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- 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.).

## 9. Result interpretation

All the result of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Endogenous Internal Control (IC) signal to verify the extraction procedure and/or correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

**It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user.** Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal in the positive control well.

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

Controls	S gene (HV 69/70 deletion) (FAM) <sup>1</sup>	ORF1ab gene (ROX) <sup>1</sup>	N gene (Cy5) <sup>1</sup>	Endogenous Internal Control (HEX)	Interpretation of Controls
<b>Positive Control (PC)</b>	≤40	≤40	≤40	≤40 <sup>2</sup>	<b>Valid</b>
<b>Negative Control (NC)</b>	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	<b>Valid</b>

Table 1. Expected Performance of Controls

1 In cases where one or more controls fail (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 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.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

<b>S gene (HV 69/70 deletion) (FAM)<sup>1</sup></b>	<b>ORF1ab gene (ROX)<sup>1</sup></b>	<b>N gene (Cy5)<sup>1</sup></b>	<b>Endogenous Internal Control (HEX)</b>	<b>Interpretation for patients' samples</b>	
≤40	≤40	≤40	≤40 or no signal <sup>1</sup>	<b>Valid</b>	<b>HV 69/70 deletion Detected</b>
≥40 or no signal	≤40	≤40	≤40 or no signal <sup>1</sup>	<b>Valid</b>	<b>SARS-CoV-2 Detected (HV 69/70 deletion not detected)</b>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal <sup>1</sup>	<b>Inconclusive</b>	If only one SARS-CoV-2 target gene amplifies, repeat test depending on the available material:  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.  After retesting one time, if at least one target gene is positive, the sample should be considered SARS-CoV-2 positive.
≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal <sup>1</sup>		
≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal <sup>1</sup>	<b>Inconclusive<sup>3</sup></b>	If S gene (HV 69/70 deletion) target gene amplifies, regardless of the amplification of other targets, repeat test depending on the available material:  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.  After retesting one time, if S gene (HV 69/70 deletion) is positive, the sample should be considered HV 69/70 deletion detected.
≤40	≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal <sup>1</sup>		
≤40	≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal <sup>1</sup>		
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤ 35 <sup>2</sup>	<b>Valid</b>	<b>Targets not Detected <sup>2</sup></b>
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥ 35 or no signal <sup>2</sup>	<b>Invalid</b>	<b>Test Failure – Repeat Testing <sup>2</sup></b>

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

**1** The endogenous Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

**2** In the case of SARS-CoV-2 target genes negative, 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 an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the endogenous Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

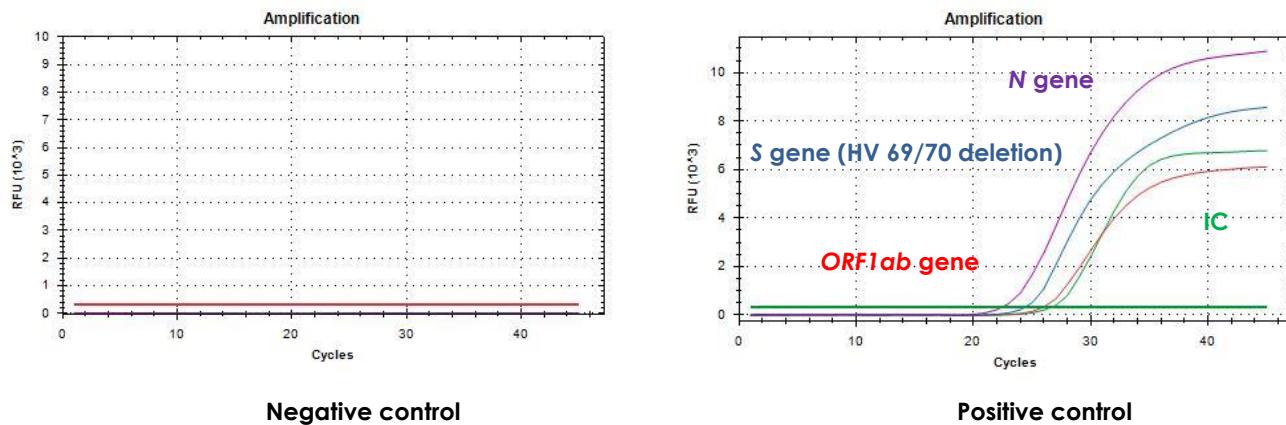
**3** A sample only positive for the S gene target, can be considered as probable positive for SARS CoV-2, probably due to a low RNA load near the detection limit or to a different amplification efficiency between the targets. It is recommended to retest the sample to confirm the result (Consult Interpretation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

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the extraction process used by the user; to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. 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.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



## 10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with RNA extracted from respiratory samples (nasopharyngeal swab).
- The quality of the test depends on the quality of the sample; properly extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2, either the high number of cDNA template copies which contains each SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) 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 detection of the ORF1ab and N genes used in VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit designed for the

detection of SARS-CoV-2, do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, or other coronaviruses (with the exception of some N and/or ORF1ab sequences from SARS-CoV, and other coronaviruses identified in bats and pangolin), which might result in predictable false positive.

- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
  - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
  - Improper processing procedures (including RNA extraction).
  - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
  - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2 variants.
  - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
  - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
  - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.

If in doubt, refer to section 9 to check the correct interpretation of the results.

- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets viral sequences.
- 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.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by SARS-CoV-2 have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2 infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Some samples may fail to exhibit RNase P amplification curves due to low human cell numbers in the original clinical sample. A negative IC signal does not preclude the presence SARS-CoV-2 RNA in a clinical specimen.

## 11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the endogenous internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit was tested using respiratory clinical samples (nasopharyngeal swabs) from patients with suspected respiratory infection. The results were as follows:

	<b>Site</b>	<b>Sample type</b>	<b>Workflow</b>	<b>Target</b>
1	Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain)	nasopharyngeal swab	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System	HV 69/70 deletion
				SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)
2	"Servicio de Microbiología" of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	nasopharyngeal swab	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System	HV 69/70 deletion
				SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)

Table 3. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *S* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

<b>Site</b>	<b>Comparator assay</b>	<b>Target</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	HV 69/70 deletion	22	38	0	0	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)	1 (0.84-1)	1 (0.90-1)
		SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)	18	42	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)	1 (0.78-1)	1 (0.91-1)
2	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	HV 69/70 deletion	50	49	0	0	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)
		SARS-CoV-2 (non HV 69/70 deletion)	49	50	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)

Table 4. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect SARS-CoV-2 and the HV 69/70 deletion using VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit has a detection limit (LoD) 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. (Figures 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of S gene (HV 69/70 deletion) ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

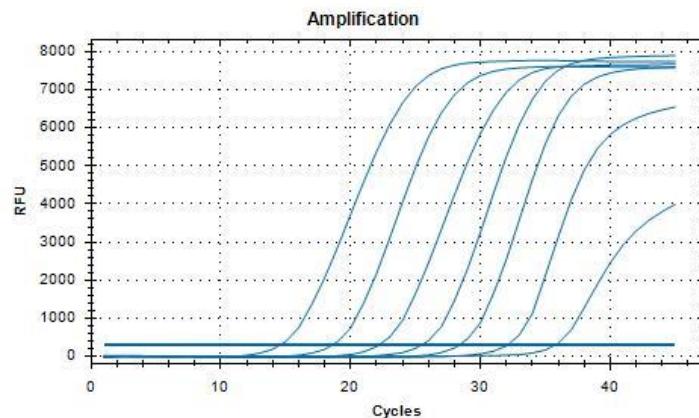


Figure 3. Dilution series of ORF1ab gene ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).

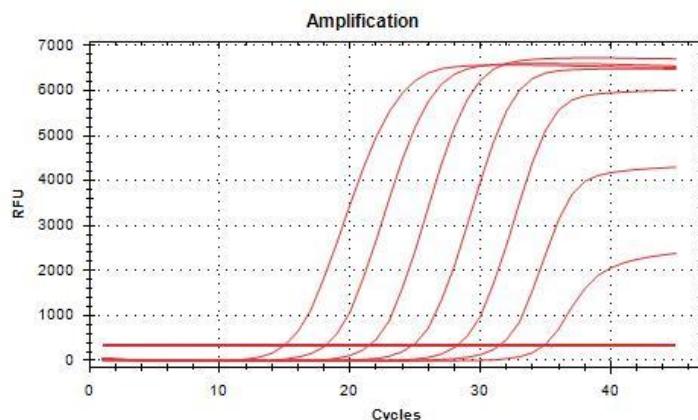
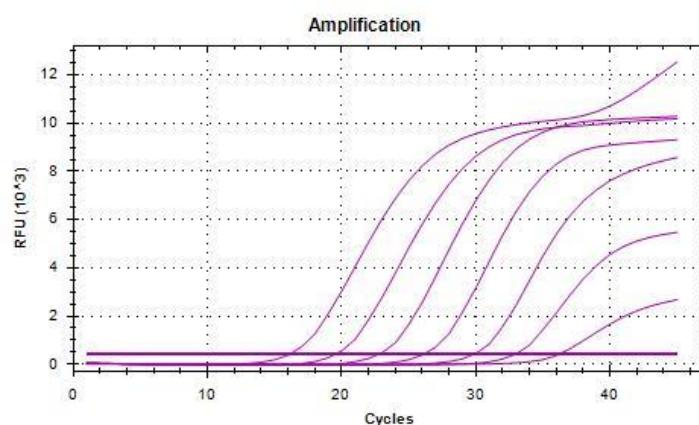


Figure 4. Dilution series of N gene ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).



## 12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human rhinovirus type C	-
MERS Coronavirus	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 and 71	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z202	-
Enterovirus Echovirus 11 and 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 and B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study

## 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of the VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit for was evaluated against 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 variants of the SARS-CoV-2 virus: 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.

## ANNEX 1

### OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-SUK206L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-SUK206H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-SUK212L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-SUK212H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-SUK213L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-SUK213H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-SUK201L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-SUK201H

Table A1 1. References

### A1.1 Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous Internal Control (IC) (human RNase P gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2 (HV 69/70 deletion)	FAM	<i>S</i> gene (HV 69/70 deletion)
SARS-CoV-2 ( <i>ORF1ab</i> gene)	ROX	<i>ORF1ab</i> gene
SARS-CoV-2 ( <i>N</i> gene)	Cy5	<i>N</i> gene
Endogenous Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	human RNase P gene

Table A1 2. Target, channel and genes.

\*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website [www.certest.es](http://www.certest.es).

### A1.2 Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible

devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SUK206L, VS-SUK206H, VS-SUK212L and VS-SUK212H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-SUK213L and VS-SUK213H.

## A1.3 Test procedure

### A1.3.1 Lyophilized positive control

SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

### A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM (HV 69/70 deletion), ROX (ORF1ab gene), Cy5 (N gene) and HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website [www.certest.es](http://www.certest.es)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

## ANNEX 2

### TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-SUK296T

Table A2. 1. References.

### A2.1 Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an endogenous internal control to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. The assay uses a human housekeeping gene as an endogenous Internal Control (IC) (human RNase P gene). Human housekeeping genes are involved in basic cell maintenance and, therefore, are expected to be present in all nucleated human cells and maintain relatively constant expression levels.

Target	Channel	Gene
SARS-CoV-2 (HV 69/70 deletion)	FAM	<i>S</i> gene (HV 69/70 deletion)
SARS-CoV-2 ( <i>ORF1ab</i> gene)	ROX	<i>ORF1ab</i> gene
SARS-CoV-2 ( <i>N</i> gene)	Cy5	<i>N</i> gene
Endogenous Internal control (IC)	HEX, VIC or JOE *	human RNase P gene

Table A2. 2.Target, channel and genes.

\*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website [www.certest.es](http://www.certest.es).

### A2.2 Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and endogenous Internal control in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant ( <i>S</i> UK, <i>ORF1ab</i> and <i>N</i> genes) Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SUK296T.

## A2.3 Test procedure

### A2.3.1 Lyophilized positive control

SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNAse free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

### A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

### A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tube in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM (HV 69/70 deletion), ROX (ORF1ab gene), Cy5 (N gene) and HEX, JOE or VIC (Endogenous Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website [www.certest.es](http://www.certest.es)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

## **ESPAÑOL**

### **1. Uso previsto**

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, ORF1ab and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit es una prueba de RT-PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa de RNA 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 en frotis nasofaríngeo procedente de individuos con sospecha de COVID-19 por su profesional de la salud. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por SARS-CoV-2, así como variantes portadoras de la delección HV 69/70 en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de los especímenes respiratorios, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar SARS-CoV-2 y la delección HV 69/70.

### **2. Introducción y explicación**

Los coronavirus son virus envueltos de RNA de cadena positiva no segmentados que pertenecen a la familia Coronaviridae. Se conocen seis especies de coronavirus que causan enfermedades humanas: cuatro virus (229E, OC43, NL63 y HKU1) que causan síntomas de resfriado común, y otros dos (coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo grave- severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV-, y el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio - Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV-) que son zoonóticos y producen complicaciones más severas. SARS-CoV y MERS-CoV han causado más de 10.000 casos acumulados en las últimas dos décadas, con unas tasas de mortalidad del 34% para MERS-CoV y 10% para SARS-CoV.

En diciembre de 2019, algunas personas que trabajaban o vivían alrededor del mercado de mariscos de Huanan en Wuhan, provincia de Hubei, China, presentaron neumonía de causa desconocida. El análisis de secuenciación masiva de las muestras respiratorias mostró un nuevo coronavirus, que fue llamado inicialmente como 2019 nuevo coronavirus (2019-nCoV) y posteriormente como SARS-CoV-2.

Se ha confirmado la transmisión de persona a persona del SARS-CoV-2, incluso en el período de incubación en asintomáticos, y el virus causa enfermedad respiratoria severa como la producida por el SARS-CoV. Aunque la neumonía es la principal enfermedad asociada, algunos pacientes han desarrollado neumonía severa, edema pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda o fallo multiorgánico y muerte. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers of Disease Control and Prevention, CDC) cree que los síntomas del SARS-CoV-2 pueden aparecer en tan solo dos días o hasta 14 tras la exposición, siendo los más comunes fiebre, tos, mialgia y disnea. Aquellos síntomas menos comunes son dolor de garganta, dolor de cabeza, diarrea y vómitos. Parece que personas mayores de 60 años, hombres y personas con comorbilidades tienen una enfermedad grave con mayor frecuencia.

El diagnóstico del SARS-CoV-2 se realiza detectando las causas convencionales de la neumonía temprana y por secuenciación masiva o métodos de RT-PCR a tiempo real. Actualmente se encuentran disponibles varios ensayos que detectan el SARS-CoV-2, como China CDC (genes objetivos, ORF1ab and *N*), Charité – Alemania (genes objetivos, RdRP y *E*) o Estados Unidos CDC (dos objetivos en el gen *N*).

CDC recomienda para la identificación de SARS-CoV-2 muestras del tracto respiratorio superior (frotis nasofaríngeos, frotis orofaríngeos, frotis nasales de la zona media del cornete nasal, frotis nasal, lavado/aspirado nasofaríngeo o muestras de lavado/aspiración nasal y muestra de saliva recolectadas principalmente por un profesional de la salud) y/o muestras de las vías respiratorias inferiores (esputo, aspirado endotraqueal o lavado broncoalveolar en pacientes con enfermedad respiratoria más grave). Además, se pueden recolectar otras muestras clínicas como sangre, orina y heces para monitorizar la presencia del virus.

Desde la caracterización genómica inicial del SARS-CoV-2, el virus se ha dividido en diferentes grupos genéticos o agrupaciones (S, L, V, G con subgrupos GH y GR). La aparición de mutaciones es un evento natural y esperado dentro del proceso de evolución del virus. De hecho, algunas mutaciones específicas definen los grupos genéticos virales que circulan actualmente a nivel mundial. Las mutaciones identificadas hasta la fecha se mantienen dentro de los patrones esperados para un coronavirus. Los virus clasificados en el grupo genético G son los más frecuentes a nivel mundial. Gracias a la secuenciación genética del patógeno a nivel mundial, ha sido posible establecer patrones de dispersión y evolución del virus.

El 14 de diciembre de 2020, Reino Unido declaró un aumento en la incidencia del SARS-CoV-2 en algunas regiones de su país asociado a una nueva variante del virus con una supuesta mayor capacidad de transmisión. Esta variante, denominada VOC202012 / 01 (B.1.1.7) presentó 23 mutaciones diferentes: 13 no sinónimas, incluyendo una serie de mutaciones en la proteína spike (S), 4 delecciones y 6 sinónimas. A finales de diciembre, esta variante se había detectado en 31 países y territorios en 5 de las 6 regiones de la OMS. Una de estas mutaciones es la delección en las posiciones 69-70 de la proteína spike. La detección de la delección HV 69/70 es de vital importancia ya que se ha relacionado con la pérdida de inmunidad en pacientes inmunosuprimidos y con una mayor infectividad viral. Otro motivo de preocupación relacionado con la delección HV 69/70 es que afecta a la sensibilidad de la detección del virus mediante técnicas moleculares (RT-PCR) que detectan el gen S.

La presencia de la delección HV 69/70 está asociada con el linaje B.1.1.7de la variante del Reino Unido, sin embargo, otras variantes como B.1.1.298 (linaje danés) o la B.1.258 también presentan esta delección.

La aparición de variantes que aumentan la transmisibilidad del virus, su virulencia o que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes generados tras la infección natural o la vacuna, constituyen un problema de salud pública de primer orden que puede tener un impacto importante en el control de la pandemia. Una preocupación con respecto a las nuevas variantes es que su detección por técnicas moleculares (RT-PCR) puede verse afectada. Por esta razón, la mayoría de las pruebas de PCR comerciales utilizan múltiples dianas ubicadas en diferentes genes del SARS-CoV-2, por lo que la probabilidad de que no se detecten nuevas variantes disminuye.

### 3. Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa de RNA de SARS-CoV-2 y de la delección HV 69/70 del gen S para SARS-CoV-2 en muestras respiratorias. La detección se realiza a través de la retrotranscripción y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de SARS-CoV-2 se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con

una región conservada del gen S para la delección HV 69/70 y con dos regiones diana conservada de los genes ORF1ab y N de SARS-CoV-2.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del quencher. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un **control interno endógeno** para controlar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano housekeeping como **control interno endógeno (IC)** (gen RNase P presente en el DNA humano). Los genes humanos housekeeping están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

## 4. Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para open format con productos con control interno y el anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

## 5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de RNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o ≤ -70°C.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Roche Molecular Diagnostics Cobas

z480 Analyzer y NEOS-96 qPCR (Linear Chemicals). Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web [www.certest.es](http://www.certest.es).

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500\*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

\*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

## 6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Reaction-Mix ha sido reconstituido puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

## 7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.

- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para referencias: VS-SUK213L y VS-SUK213H). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad 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.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNase)/desoxirribonucleasa (DNase) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNase/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar/aplicar de productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), "VIASURE Real Time PCR Detection Kits" no requiere ficha de datos de seguridad debido a que se clasifica como no peligroso para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

## 8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para open format con productos con control interno y el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno.

### 8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection kit ha sido validado en muestras nasofaríngeas recolectados con hisopos de plástico con fibras sintéticas y colocados inmediatamente en un tubo de transporte estéril que contiene medio de transporte universal (UTM). Otros tipos de muestras diferentes deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras respiratorias se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Los especímenes pueden ser transportados entre 2-8°C hasta 72 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 72 horas, se recomienda realizar el envío a ≤-20°C o menos. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 72 horas o pueden congelarse a -20°C o idealmente a -70°C para su conservación durante un tiempo prolongado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras respiratorias deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas. Para más detalle, consulte la guía CDC (Specimen collection guidelines. Sitio web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> y Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Sitio web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) y la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

### 8.2. Extracción de RNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de RNA a partir de muestras respiratorias puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y 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 sistema de extracción automatizado KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando el sistema de extracción automatizado magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

## 9. Interpretación de resultados

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Verifique la señal de control interno endógeno (CI) para verificar el procedimiento de extracción y/o el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

**Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.** Utilice la curva de amplificación de 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.

El uso de controles positivos y negativos en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo. Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Gen S (Deleción HV 69/70) (FAM) <sup>1</sup>	Gen ORF1ab (ROX) <sup>1</sup>	Gen N (Cy5) <sup>1</sup>	Control Interno endógeno (HEX)	Interpretación de controles
<b>Control Positivo (CP)</b>	≤40	≤40	≤40	≤40 <sup>2</sup>	<b>Válido</b>
<b>Control Negativo (CN)</b>	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	<b>Válido</b>

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles.

**1** En los casos en los que falle uno o varios controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

**2** 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.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra del paciente, use la siguiente tabla:

Gen S (Delección HV 69/70) (FAM) <sup>1</sup>	Gen ORF1ab (ROX) <sup>1</sup>	Gen N (Cy5) <sup>1</sup>	Control Interno endógeno (HEX)	Interpretación para muestras de pacientes	
≤40	≤40	≤40	≤40 o no señal <sup>1</sup>	Válido	Delección HV 69/70 Detectado
≥40 o no señal	≤40	≤40	≤40 o no señal <sup>1</sup>	Válido	SARS-CoV-2 Detectado (Delección HV 69/70 no detectada)
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal <sup>1</sup>	Inconclusivo	<p>Si únicamente amplifica un gen diana de SARS-CoV-2, repita el test dependiendo del material disponible:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente),</li> <li>b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o,</li> <li>c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada.</li> </ul> <p>Después de repetir la prueba una vez, si al menos un gen diana resulta positivo, la muestra debe considerarse positiva para SARS-CoV-2.</p>
≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal <sup>1</sup>	Inconclusivo <sup>3</sup>	<p>Si el gen diana S (Delección HV 69/70) amplifica, <u>independientemente de la amplificación de otras dianas</u>, repita el test dependiendo del material disponible:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y volver a testar (idealmente),</li> <li>b) volver a extraer otra alícuota de la misma muestra y volver a probar o,</li> <li>c) repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada.</li> </ul> <p>Después de 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.</p>
≤40	≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal <sup>1</sup>		
≤40	≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal <sup>1</sup>		
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤ 35 <sup>2</sup>	Válido	RNA molde diana no Detectado <sup>2</sup>
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥35 o no señal <sup>2</sup>	No Válido	Test fallido – Repita el test <sup>2</sup>

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct valores. sin señal = sin curva de amplificación.

**1** El control interno endógeno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

**2** En el caso de que los genes diana de SARS-CoV-2 resulten negativos, 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 human 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 "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1:

100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

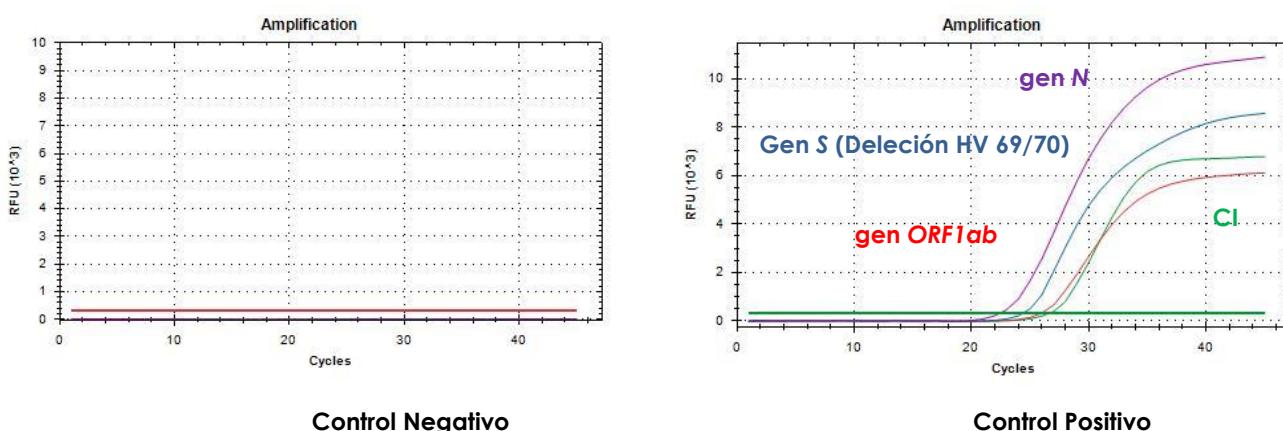
**3** Una muestra que sea solo positiva para el gen S, puede considerar como probable positiva para SARS-CoV-2, probablemente debido a una baja carga viral de RNA cercana al límite de detección o a una eficiencia de amplificación diferente entre las dianas. Se recomienda volver a analizar la muestra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

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.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmaidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Dependiendo del material disponible:

- repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada,
- volver a extraer y volver a probar otra alícuota de la misma muestra o,
- obtener un nuevo espécimen y volver a testar.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System



## 10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras respiratorias (frotis nasofaríngeo).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con SARS-CoV-2 ya sea por el gran número de copias de molde cDNA que contiene cada vial SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab

*and N genes) 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 *VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit* diseñado para la detección de SARS-CoV-2, no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana, u otros coronavirus (con la excepción de algunas secuencias del *N* y/o *ORF1ab* de SARS-CoV, y de otros coronavirus identificados en murciélagos y pangolín), que pudiera originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
  - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
  - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de RNA).
  - Degradación del RNA viral durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
  - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas de SARS-CoV-2.
  - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
  - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir COVID-19 o durante el tratamiento de la infección.
  - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.

En caso de duda, consulte la sección 9 para comprobar la interpretación correcta de los resultados.

- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que estos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias virales diana.
- 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.
- Resultados negativos o la amplificación de una única diana no excluyen padecer la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por SARS-CoV-2. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el virus.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades respiratorias son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección SARS-CoV-2, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- 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.

## 11. Control de calidad

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno endógeno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit fue evaluado utilizando muestras clínicas respiratorias (frotis nasofaríngeos) de pacientes con sospecha de infección respiratoria. using respiratory clinical samples from patients with suspected respiratory infection. Los resultados fueron los siguientes:

	<b>Sitio</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Workflow</b>	<b>Diana</b>
1	Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain)	Frotis nasofaríngeos	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Delección HV 69/70
	"Servicio de Microbiología" of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	Frotis nasofaríngeos	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System	SARS-CoV-2 (No delección HV 69/70)
2	"Servicio de Microbiología" of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain)	Frotis nasofaríngeos	MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Delección HV 69/70
				SARS-CoV-2 (No Delección HV 69/70)

Tabla 3. Sitio, tipo de muestra, workflow y target.

Se calcularon los valores verdaderos positivos y negativos, falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad, PPV y NPV para VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit en relación a cada test comparador tal y como se muestra en la siguiente tabla:

<b>Sitio</b>	<b>Test comparador</b>	<b>Diana</b>	<b>TP</b>	<b>TN</b>	<b>FP</b>	<b>FN</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>PPV</b>	<b>NPV</b>
1	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	<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)
2	TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit molecular assay + sequencing	<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)

Tabla 4. verdaderos positivos y negativos, falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad, PPV y NPV para VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar SARS-CoV-2 y la Delección HV 69/70 utilizando VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección (LoD) 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* (Figuras 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar del gen *S* (delección 69/70) ( $10^7$ - $10^1$ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

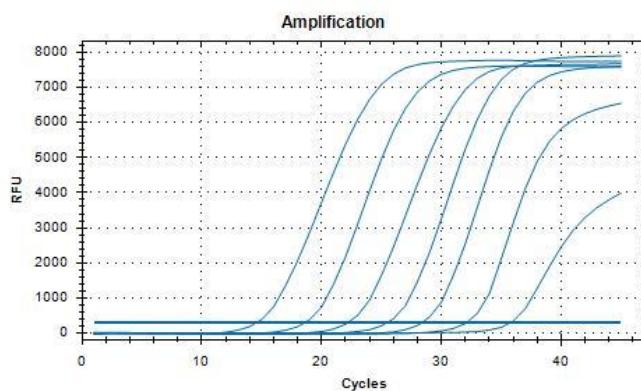


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar del gen *ORF1ab* ( $10^7$ - $10^1$ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).

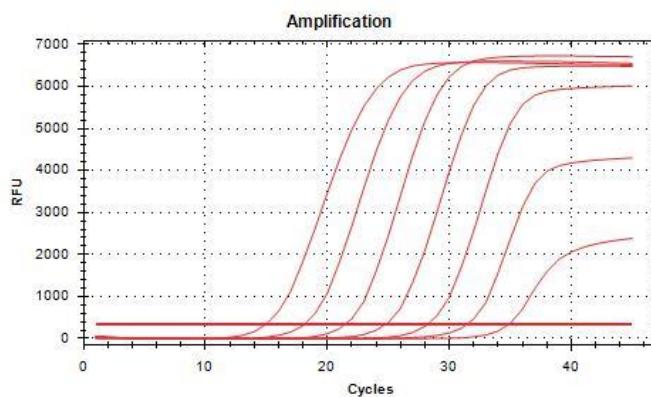
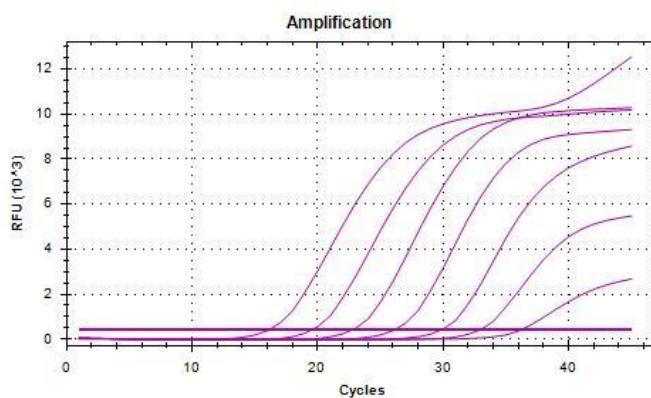


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del gen *N* ( $10^7$ - $10^1$ copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).



## 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de SARS-CoV-2 fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Test de reactividad cruzada					
Adenovirus Tipo 1-5, 8, 15, 31, 40 y 41	-	Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavirus humano	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	Virus metapneumovirus humano A y B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> not rifampin resistant	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotipos A and C	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	Virus Parainfluenza humanos 1, 2, 3 y 4	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CM-1	-	Influenza A/South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i>	-
Coronavirus humano 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Virus rhinovirus humano tipo C	-
Coronavirus MERS	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Enterovirus 68 y 71	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z2022	-
Enterovirus Echovirus 11 y 30	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Enterovirus Coxsackievirus A24, A9 y B3	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-	Virus Respiratorio Sincitial (VRS) A y B	-

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

## 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a RNA extraído a partir del virus 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 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..

## ANEXO 1

### OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-SUK206L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-SUK206H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-SUK212L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-SUK212H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-SUK213L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-SUK213H
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-SUK201L
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-SUK201H

Tabla A1. 1.Referencias

### A1.1 Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un **control interno endógeno** para controlar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano housekeeping como **control interno endógeno (IC)** (gen RNase P presente en el DNA humano). Los genes humanos housekeeping están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
SARS-CoV-2 (Delección HV 69/70)	FAM	gen S (Delección HV 69/70)
SARS-CoV-2 (gen ORF1ab)	ROX	gen ORF1ab
SARS-CoV-2 (gen N)	Cy5	gen N
Control Interno endógeno(CI)	HEX, VIC o JOE *	gen RNase P presente en el DNA humano

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

\*Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web [www.certest.es](http://www.certest.es).

### A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar

con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SUK206L, VS-SUK206H, VS-SUK212L y VS-SUK212H.

Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores- sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SUK213L y VS-SUK213H.

## A1.3 Procedimiento del test

### A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAse (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

### A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla A1. 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM (Delección HV 69/70), ROX (gen ORF1ab), Cy5 (gen N) y HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web [www.certest.es](http://www.certest.es)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

## ANEXO 2

### FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-SUK296T

Tabla A2. 1. Referencias.

#### A2.1 Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un **control interno endógeno** para controlar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. El ensayo utiliza un gen humano housekeeping como **control interno endógeno (IC)** (gen RNase P presente en el DNA humano). Los genes humanos housekeeping están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
SARS-CoV-2 (Delección HV 69/70)	FAM	gen S(Delección HV 69/70)
SARS-CoV-2 (gen ORF1ab)	ROX	gen ORF1ab
SARS-CoV-2 (gen N)	Cy5	gen N
Control Interno endógeno(CI)	HEX, VIC o JOE *	gen RNase P presente en el DNA humano

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

\*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web [www.certest.es](http://www.certest.es).

#### A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivos/Material	Descripción	Color	Cantidad
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno endógeno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 & UK Variant (S UK, ORF1ab and N genes) Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SUK296T.

## A2.3 Procedimiento del test

### A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

### A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

### A2.3.3 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de SARS-CoV-2 & UK Variant (*S* UK, *ORF1ab* and *N* genes) Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest [www.certest.es](http://www.certest.es)).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

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

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM (Deleción HV 69/70), ROX (gen ORF1ab), Cy5 (gen N) y HEX, JOE o VIC (Control Interno endógeno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web [www.certest.es](http://www.certest.es)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

## Bibliography/Bibliografía

1. Huang, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
3. World Health Organization. MERS situation update. January 2020. Available from <https://applications.emro.who.int/docs/EMCSR254E.pdf?ua=1> Accessed January 2021.
4. Chen N. et al.. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Lv D.F. et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-CoV-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* 2020; 506: 172-175.
6. World Health Organization. Clinical management of COVID-19 disease" Interim guidance 27 May 2020. Available from <https://www.who.int/publications/item/clinical-management-of-covid-19> Accessed January 2021.
7. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
8. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
9. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Symptoms of Coronavirus. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed January 2021.
10. 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 January 2021.
11. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed January 2021.
12. Yan Y et al. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Reviews in Medical Virology* 2020; 30(3):e2106.
13. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf> Accessed January 2021.
14. Chu D.K.W. et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry* 2020;66(4): 549-555.
15. Corman V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *European communicable disease bulletin* 2020;25(3).
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update – 12 March 2020. Stockholm: ECDC; 2020. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf> Accessed January 2021.
17. Lim, Y. X., Ng, Y. L., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2016). Human coronaviruses: a review of virus–host interactions. *Diseases*, 4(3), 26.

18. McBride R. et al. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 2014; 6(8):2991-3018.
19. Sheikh A. et al. Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of Virological Methods* 2020; 277:113806.
20. World Health Organization. Public health surveillance for COVID-19. 16 December 2020. Available from [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)) Accessed January 2021.
21. G. Neumann et al. Transmission of Influenza A viruses. *Virology* 2015; 234-246.
22. Y. Yang et al. Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2010; 167(1): 37-44.
23. R.L. Kuo et al. Influenza A/B virus detection and influenza A virus subtyping with emphasis on the novel H7N9 virus by using multiplex real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2014; 208:41-46.
24. W.P. Glezen et al. The burden of Influenza B: A structured literature review. *American Journal of Public Health* 2013; 103(3): 43-51.
25. F. de-Paris et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *Journal of Virological Methods* 2012; 186(1-2): 189- 192.
26. M. Hindiyeh et al. Evaluation of Simplexa Flu A/B & RSV for direct detection of influenza viruses (A and B) and respiratory syncytial virus in patient respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(7): 2421-2424 .
27. World Health Organization. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus—update. Available: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/molecular\\_diagnosis/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/). Accessed 2015 Dec 30.
28. Enfermedad por coronavirus, COVID-19, Información Científica-técnica. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad, España. 01-2021.

## Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

<b>IVD</b>	<i>In vitro diagnostic device</i> Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Keep dry Almacenar en lugar seco	 Use by Fecha de caducidad	 Manufacturer Fabricante	<b>LOT</b> Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	<b>REF</b> Catalogue number Número de referencia

## 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.

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

Revision: March 2021







VIASURE

**bestbion dx GmbH**  
Horbeller Str. 33  
50858 Köln  
Deutschland

Telefon: +49 2234 98795 - 0  
Telefax: +49 2234 98795 - 29  
Email: service@bestbion.com  
Internet: [www.bestbion.com](http://www.bestbion.com)



[www.cerfest.es](http://www.cerfest.es)

One step ahead



F-566 rev00