

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System
para ser utilizado con el sistema BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in respiratory samples from patients with signs and symptoms of COVID-19 infection. This test is intended to be used as an aid in the identification in the diagnosis of COVID-19 in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA from respiratory specimens is detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2.

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to *Coronaviridae* family [1,2]. There are six coronavirus species known to cause human diseases [2]. 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 [2]. 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 [1,3].

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 [2,4]. 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 [5].

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 [1,6,7]. 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 [1,4]. Centers 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 [1,4,8]. Less common symptoms are sore throat, headache, diarrhea and vomiting [1,4]. It seems that older males with comorbidities have been more affected [4].

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 [1,9]. Several assays that detect the SARS-CoV-2 have been are currently available, and listed on the WHO (World Health Organization) website <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage) for the identification of SARS-



CoV-2 [9,11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [9,11].

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification of SARS-CoV-2 in respiratory samples. The detection is done in one step real time RT-PCR 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 *S* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound 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 the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains in each tube all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. SARS-CoV-2 is amplified and detected in channel 475/520 and the internal control (IC) in in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Green foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-NCO124 (444212).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves

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.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, they can be used for up to 28 days.

7. Precautions for users

- For professional Use.
- 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.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- 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.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- 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 S gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- 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.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious 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, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.



8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit has been validated on negative nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) (Viracell S.L., Spain) and nucleic acid isolated from positive nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.

Another different types of samples from nasopharyngeal/oropharyngeal swabs in VTM 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 48 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 48 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 48 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.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette 200 µL of nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) into a BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.
- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".



- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to 700 µL.
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 2. PCR settings.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

		False Receiving Channel				
Channel		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 3. Spectral cross-talk parameters.

- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Table 4. PCR protocol.

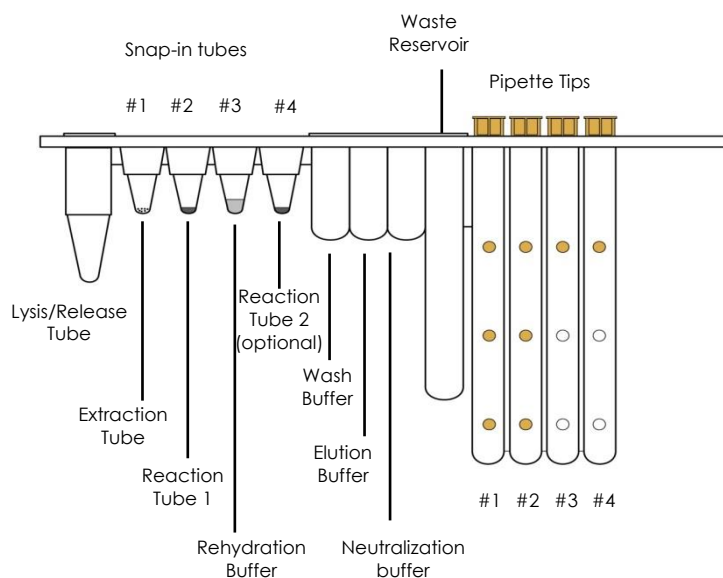
- 11) Click the "Save Test" button.



8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- 1) For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- 2) Remove the required number of BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
- 3) Determine and separate the appropriate number of VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (green foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - a. Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - b. In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.
 - i. Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- 4) Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
 - a. In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.

Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.



- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 S gene (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4 BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen

9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 5.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

-Results should be read and analyzed using the following table:



SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA Not Detected
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Detected
-	-	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.
IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control may or may not show an amplification signal because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection of the IC is not necessary.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay diluting the sample 1:10 to check for possible problems of inhibition.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care 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 with nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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 suspicious samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.



- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

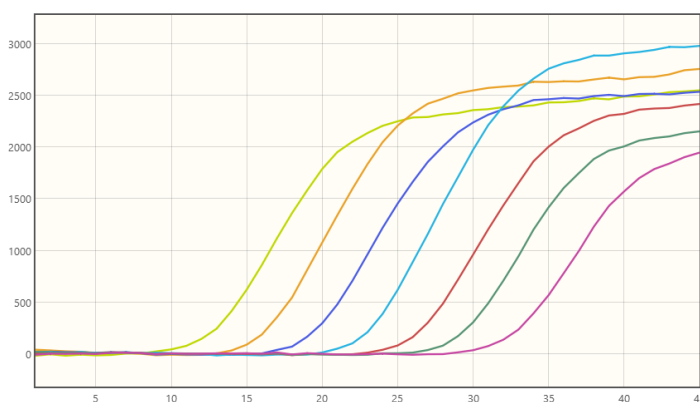
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical suspicion of COVID-19 disease or other similar respiratory diseases. Four SARS-CoV-2 positive samples were found and these results were in agreement with a PCR test developed according to the China CDC Primers and probes for detection 2019-nCoV. Additionally, the 4 SARS-CoV-2 positive samples were confirmed using a molecular detection method by the Spanish National Reference Center (Institute of Health Carlos III (ISCIII)) (the protocol "2019-nCoV by real-time RT-PCR" suggested by Charité (Berlin), with modifications).

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect SARS-CoV-2 using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 24 cDNA copies per reaction (cp/rxn) with a positive rate of $\geq 95\%$.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 *S* gene (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 *S* gene 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:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-	Human rhinovirus	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-		

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, showing positive result.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica del 2019 Nuevo Coronavirus (SARS-CoV-2) en muestras respiratorias procedentes de pacientes con signos y síntomas de COVID-19. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de COVID-19 en combinación con los signos y síntomas clínicos del paciente y los factores de riesgo epidemiológico. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción del RNA y posterior RT-PCR a tiempo real utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. 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.

2. Introducción y explicación

Los coronavirus son virus envueltos de RNA de cadena positiva no segmentados que pertenecen a la familia *Coronaviridae* [1,2]. 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 [2]. 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 [1,3].

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 [2,4]. 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 [5].

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 [1,6,7]. 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 [1,4]. 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 [1,4,8]. Aquellos síntomas menos comunes son dolor de garganta, dolor de cabeza, diarrea y vómitos [1,4]. Parece que los hombres mayores con comorbilidades se han visto más afectados [4].

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 [1,9]. Actualmente se encuentran disponibles varios ensayos que detectan el SARS-CoV-2, y se encuentran enumerados en el sitio web de la WHO (*World Health Organization*, Organización Mundial de la Salud (OMS)) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].



WHO recomienda muestras del tracto respiratorio superior (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos) y/o muestras de las vías respiratorias inferiores (esputos, aspirados endotraqueales o lavados broncoalveolares) para la identificación de SARS-CoV-2 [9,11]. Además, se pueden recolectar otras muestras clínicas como sangre, orina y heces para controlar la presencia del virus [9,11].

3. Procedimiento

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación del 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 diana conservada del gen *S*.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene 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 el equipo BD MAX™.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene 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) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación, SARS-CoV-2 se detecta en el canal 475/520 y el control interno (CI) se detecta en el canal 530/565.

4. Reactivos suministrados

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente Sellado Verde	2 sobres de 12 tubos
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Transparente Sellado Naranja	1 sobre de 24 tubos

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit con Ref.VS-NCO124 (444212).

5. Reactivos y equipos requeridos y no suministrados

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 or 442828)



- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

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.
- El kit puede usarse hasta 28 días después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- 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.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso. 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.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Proteger y conservar los componentes alejados de la luz.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (*cartridges*).
- 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.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.



- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas 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.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales

8. Procedimiento del test

8.1. RECOLECCIÓN, ALMACENAJE Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit ha sido validado en frotis nasofaríngeos/orofaríngeos negativos recolectados en medio de transporte viral (VTM) (Viricell S.L., España) y en ácidos nucleicos extraídos de frotis nasofaríngeos/orofaríngeos positivos recolectados en VTM.

Otros tipos de muestras diferentes a los hisopos nasofaríngeo/ orofaríngeo en VTM 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 48 horas, conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para transportes largos de duración mayor de 48 horas, se recomienda realizar el envío a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Las muestras pueden almacenarse entre 2-8°C hasta 48 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.

8.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE RNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3. Hay que puntualizar que otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo. La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario.

1. Pipetear 200 μL de hisopo nasofaríngeo/orofaríngeo recolectado en medio de transporte viral (VTM) en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón con el tapón perforable. Asegurar que se mezcla completamente vorteando la muestra 1 minuto a alta velocidad. Proceder con BD MAX™ System Operation.



8.3. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA BD MAX™

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

8.3.1. Programación de la prueba VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection kit, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla "Run" del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña "Test Editor".
- 2) Hacer click en el botón "Create".
- 3) En la ventana "Test Name", escribir el nombre del test: ej. VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) En el menu desplegable "Extraction Type", seleccionar "ExK TNA-3".
- 5) En el menu desplegable "Master Mix Format", elegir "Type 5"
 - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso seleccionar "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) En "Sample extraction parameters" seleccionar "User defined" y ajustar el volumen de la muestra a 700 µL.
- 7) En "Ct Calculation" seleccionar "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) En la pestaña "PCR settings" introducir los siguientes parámetros: "Channel Settings", "Gains" y "Threshold" (Tabla 2).
 - a. Nota: El producto puede ser usado junto con otros productos VIASURE para BD MAX™, en este caso completar "PCR Settings" y "Test Steps" para ambas posiciones, 2 (verde) y 4 (azul).

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabla 2. PCR settings.

- 9) En la pestaña "PCR settings" introducir también los parámetros "Spectral Cross Talk" (Tabla 3)

		False Receiving Channel				
		Channel	475/520	530/565	585/630	630/665
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Tabla 3. Parámetros "Spectral cross-talk".



- 10) En la pestaña "Test Steps", introducir el protocolo de PCR (Tabla 4).

Step Name (Etapa)	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabla 4. PCR protocol.

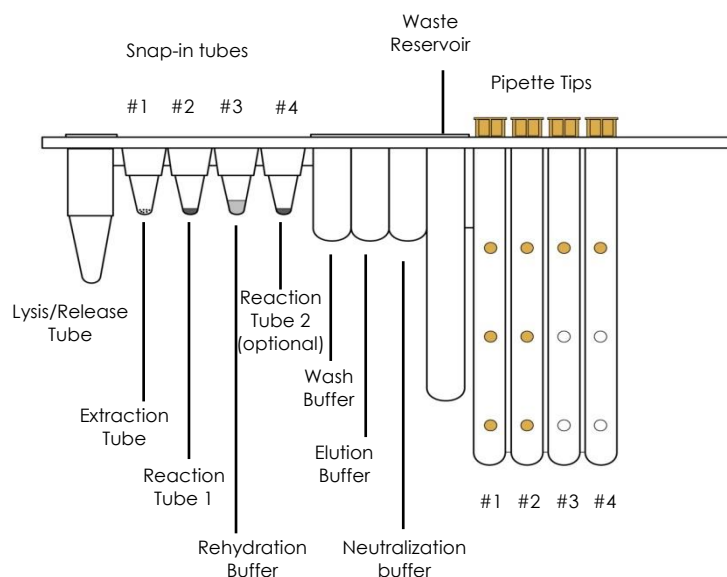
- 11) Hacer click en el botón "Save Test".

8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- 1) Para cada espécimen, coger una tira de reactivos individual (BD MAX™ ExK TNA-3 Reagent Strip (TNA)) del kit de extracción (BD MAX™ ExK TNA-3 kit). Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- 2) Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protector. Colocar el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- 3) Calcular y separar el número adecuado de VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (sello verde) y colocarlos en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo.
 Nota: Si elige el formato "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Sección 8.3.1), calcular y separar el número adecuado de tubos de reacción de los test VIASURE adicionales (sellado de color diferente) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 4. Código de color azul en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tube (sello naranja) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
 - a. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo.



Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA)) del kit de extracción BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña "Work List" en la pantalla "Run" utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable "Test", seleccionar VIASURE SARS-CoV-2 S gene (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del tubo de tampón de muestra BD MAX™ ExK TNA-3 en la ventana de "Sample tube" dentro de la pestaña "Work list", ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir la identificación de la muestra/paciente y/o "Accession" en la pestaña "Work list" y haga clic en el botón "Save". Continúe hasta que se introduzcan todos los Sample Buffer Tubes. Asegúrese de que la identificación la muestra/paciente y los Sample Buffer Tubes estén correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start Run" para comenzar con el procedimiento.

8.3.4 Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer click en el botón "Results".
- 2) Hacer doble click en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view".



- 3) Hacer click en el botón "Print", seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Hacer click en el botón "Print or Export" de la pantalla "Run Report".

9. Interpretación de los resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no calculó ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 2). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según las pautas de interpretación descritas en la Tabla 5.

Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

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

SARS-CoV-2 S gen (475/520)	Control Interno (530/565)	Interpretación
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA No Detectado
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Detectado
-	-	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación
IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error.
INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba.

Tabla 5. Interpretación

+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. 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.



Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

En caso de obtener resultado sin resolver (UNR), ausencia de la señal de control interno en muestras negativas, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

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.

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 hisopos nasofaríngeos/orofaríngeos en VTM.
- 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 respiratorias. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- 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 muestras sospechosas de SARS-CoV-2, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- En el caso de obtener con VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit resultados no resueltos, indeterminados o incompletos se requiere volver a testar de nuevo. Los no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

11. Control de calidad

VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit contiene un control interno (CI) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El test VIASURE SARS-CoV-2 *S gene* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado utilizando 4 ácidos nucleicos extraídos de frotis nasofaríngeos y/u orofaríngeos positivos recogidos en VTM y 15 muestras respiratorias (frotis nasofaríngeos y/u orofaríngeos positivos recogidos en VTM) procedentes de pacientes con sospecha clínica de COVID-19 u otras



enfermedades respiratorias similares. Las 4 muestras resultaron positivas para SARS-CoV-2 y fueron confirmadas mediante un test basado en la técnica PCR y diseñado y desarrollado a partir de los primers y sondas propuestos por el centro de control de enfermedades (CDC) de China.

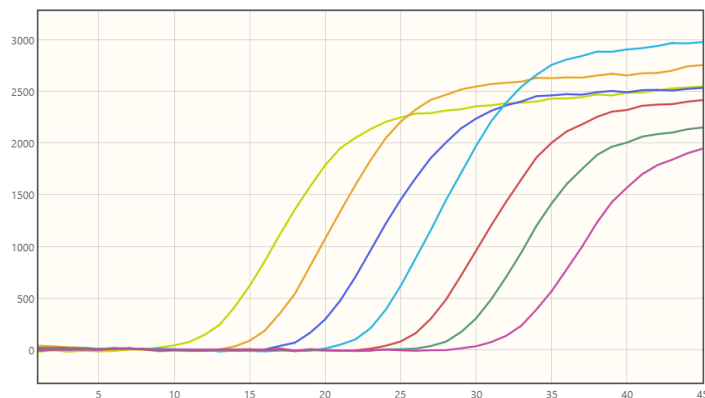
Además, estas 4 muestras positivas se confirmaron mediante un método de detección molecular en el Centro Nacional de Referencia (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)) (siguiendo el protocolo "2019-nCoV by real-time RT-PCR" sugerido por Charité (Berlín), con modificaciones).

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar SARS-CoV-2, utilizando VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 24 copias de cDNA por reacción (cp / rxn) con una tasa positiva $\geq 95\%$.

Figura 2. Diluciones seriadas de SARS-CoV-2 *S* gen (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de SARS-CoV-2 *S* gene fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos respiratorios más comunes. No se detectan reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados:



Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Perth/16/2009(H3N2)-like virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/DE-SH/Reiherente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza B/Brisbane/60/2008-like virus	-	Human rhinovirus	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
SARS Coronavirus	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV)	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-		

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a la cepa de RNA de 2019-nCoV humano BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, mostrando un resultado positivo.











13. Bibliography/Bibliografía

- 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.
- Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine.*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMoa2001017.
- World Health Organization. MERS situation update. December 2019. Available from <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1> Accessed March 2020.
- 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.
- Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Actualizado a 27 de febrero de 2020. Available from https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf Accessed March 2020.
- 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.



7. 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.
8. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Available from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html> Accessed March 2020.
9. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 January 2020. Available from <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> Accessed March 2020.
10. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Available from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> Accessed March 2020.
11. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Interim guidance. 27 February 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 March 2020.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 <p><i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>	 <p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>	 <p>Use by Fecha de caducidad</p>	 <p>Manufacturer Fabricante</p>	 <p>Batch code (Lot) Número de lote</p>
 <p>Consult Instructions for Use Consultar las instrucciones de uso</p>	 <p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>	 <p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	 <p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>	 <p>Catalognumber Número de referencia</p>

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01
VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC