

GSD NovaType SARS-CoV-2 ID

RT-PCR

RUO

FOR RESEARCH USE ONLY
Not for use in diagnostic procedures

English	2
Deutsch	6
Français	11
Italiano	16
Español	21
Português	26
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	31
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	31
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	32

Product Number:	PCOV6050T	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6054T	(4 x 96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

End of 2019, a novel respiratory disease emerged in the city of Wuhan, Hubei Province of the People's Republic of China, and soon spread rapidly within the country and worldwide. The causative agent was identified as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). SARS-CoV-2 (2019-nCoV), like the closely related SARS coronavirus (SARS-CoV), belongs to the genus Betacoronavirus within the family of coronaviruses. The zoonotic reservoir of the virus appears to be bats.

Coronaviruses are enveloped, positive single-stranded large RNA viruses that infect humans, but also a wide range of animals. The common human coronaviruses NL63, 229E, OC43 and HKU1 are widespread especially throughout the winter months. They are responsible for up to one third of all acute respiratory diseases, typically with mild symptoms (common cold). More than 80 % of the adult population have antibodies against human coronaviruses. The immunity from previous infections lasts only for a short period of time. Therefore, reinfections with the same pathogen are possible just after one year.

SARS-CoV-2 is predominantly transmitted by droplet infection via coughing or sneezing and through close contact with infected patients. In theory, smear infection and infection through the conjunctiva of the eyes are also possible. The incubation period is in the median 5–6 days (and up to 14 days maximum).

The clinical manifestations of SARS-CoV-2-related COVID-19 disease include fever, cough, respiratory problems and fatigue. In most patients the infection manifests with symptoms of a mild febrile illness with irregular lung infiltrates.

The initial clinical sign of COVID-19 which allowed case detection was pneumonia. But it turned out that the course of the disease is non-specific and varies widely, from asymptomatic courses to severe pneumonia with lung failure and death. However, based on current knowledge, around 80 % of the illnesses are mild to moderate.

Although severe courses of the disease also occur in younger patients and people without previous illness, the following groups of people have an increased risk of serious forms of the disease: elderly people (with a steadily increasing risk from around 50-60 years of age), smokers and people with certain diseases of the cardiovascular system or the lungs, patients with chronic liver diseases, diabetes mellitus, cancer, or patients with a weakened immune system (e.g. due to immune deficiencies or by taking drugs that suppress the immune system).

Treatment focuses on supportive measures depending on the severity of the clinical picture (e.g. oxygen administration, fluid balance management, etc.) as well as the treatment of relevant underlying diseases. Various specific therapeutic approaches (directly antiviral effective, immunomodulatory effective) have been and are being investigated in studies during the course of the SARS-CoV-2 pandemic.

In late 2020 two COVID-19 variants were identified that show mutations in different positions of the S gene, coding for the spike protein. Some of these mutations result in higher infectivity. In particular mutation N501Y is identified as one root cause. This mutation is found in virus isolates in United Kingdom (UK), lineage B.1.1.7, and in South Africa, lineage B.1.351. These two variants can be distinguished by mutation A570D which is additionally present only in the variant from UK.

Species	Disease	Symptoms e.g.	Transmission route
SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)	COVID-19	the course of the disease is unspecific, diverse and varies greatly, from asymptomatic courses to severe pneumonia with lung failure and death	primary mode of transmission: droplet infection; smear infections and infections via the conjunctiva of the eyes are theoretically possible

Infection or presence of pathogen may be identified by

- Nucleic acid Amplification Techniques (NAT): e.g. RT-PCR
- Serology: detection of antibodies by e.g. ELISA

2. INTENDED USE (FOR RESEARCH USE ONLY!)

The GSD NovaType SARS-CoV-2 ID is a research use only (RUO) real-time reverse transcription PCR assay designed for the simultaneous qualitative detection and discrimination of the SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) S gene variants wildtype, and mutations N501Y and A570D. Sample material should be genomic RNA extracted from human respiratory (nasal wash/smear, nasopharyngeal wash/smear, oropharyngeal swab, bronchoalveolar lavage, and gargle solution) specimen types that have previously tested positive for SARS-CoV-2 RNA by diagnostic RT-PCR methods e.g. GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19). The GSD NovaType SARS-CoV-2 ID is expressly not intended for diagnosis of SARS-CoV-2 infection and not for use in diagnostic procedures. It is only designed to aid investigations related to the prevalence and frequency of virus variants.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative determination of specific RNA is based on Real-Time reverse-transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technology. The kit contains specific primers and probes labelled with fluorescent reporter and quencher dyes for amplification and simultaneous detection of specific RNA sequences which represent **specific SARS-CoV-2 S gene variants**.

The gene of interest specific probes are labelled with the fluorophores HEX™ and FAM™ thereby allowing parallel discrimination between S gene wildtype and mutations N501Y and A570D.

The GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR has been validated for following real-time PCR platforms:

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems™)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- AriaDx™ (Agilent Technologies)

4. MATERIALS

4.1. Reagents Provided

Cap	Symbol	Component	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Number of Vials	Volume per Vial [µL]
green	E-MIX	RT-PCR Enzyme Mix (reverse transcriptase, hot-start DNA polymerase, RNase inhibitor, nucleotides, magnesium, stabilizers and buffer)	1 (4)	550
blue/white	PP VAR	Primer-Probe-Mix (for discrimination of variants)	1 (4)	350

4.2. Materials and Equipment needed, but not provided

- Deionized nuclease-free and nucleic-acid free water
- Real-Time PCR instrument (for already validated instruments refer to 3.PRINCIPLE OF THE ASSAY)
Alternative Real-Time PCR instruments might also be appropriate. Their suitability for use with the GSD NovaType SARS-CoV-2 ID has to be validated by the user.
- Appropriate Real-Time PCR consumables (e.g. disposable tubes, reaction plates, corresponding optical closing materials)
- Benchtop microcentrifuge
- Centrifuge with a rotor for microtiter plates
- Vortex mixer
- Adjustable pipettes in relation to reaction setup
- Disposable DNase/RNase free pipette tips with filters
- Disposable powder-free gloves

5. STABILITY AND STORAGE

The GSD NovaType SARS-CoV-2 ID kit is shipped on dry ice and all components should arrive frozen.

- All components have to be stored between -30 °C and -15 °C immediately after arrival.
- Repeated freeze thaw cycles (more than two) of reagents should be avoided, since this might affect the performance of the kit. Reagents should be frozen in aliquots if they are used intermittently.
- Keep unfrozen storage (e.g. storage on ice) as short as possible.
- Keep the E-MIX and the PP | VAR in the freezer, until you are ready to use it.
- Protect the E-MIX and the PP | VAR from light.

6. SAMPLE PREPARATION

- Extracted RNA or total nucleic acid extracted from human respiratory specimen types (nasal lavage/smear, nasopharyngeal lavage/smear, oropharyngeal swab, bronchoalveolar lavage, and gargle solution) previously tested positive for SARS-CoV-2 RNA by RT-PCR methods e.g. GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) is the starting material for the GSD NovaType SARS-CoV-2 ID.
- The quality of the extracted RNA has a crucial effect on the performance of the entire RT-PCR test system. Make sure that the nucleic acid extraction method is compatible with Real-Time PCR technology.

7. ASSAY PROCEDURE

7.1. Reaction Setup

- Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Reliability of results depends on following strictly the instructions for use.
- Before use make sure that all samples and reagents are thawed completely, mixed by up and down pipetting or vortexing and centrifuged briefly.
- Important: E-MIX is viscous. Briefly spin down the tube to ensure material has not lodged in the cap or side of tube. Be sure to pipette and dispense carefully, and use pipette tips suitable for pipetting viscous liquids.
- The use of nuclease-free and nucleic-acid free water as no template control (NTC) is highly recommended.
- Define the positions (wells) for samples and controls (NTC) on the plate.

Reaction Setup	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Sample or NTC	12 µL
Total volume	20 µL

- Close the optical reaction plate with corresponding optical closing material.
- Centrifuge the optical reaction plate in a centrifuge with a rotor for microtiter plates for 60 seconds at approximately 1000 x g (~ 3000 rpm).

7.2. Programming the Real-Time PCR Instrument

Regarding setup and programming of the Real-Time PCR instrument, please use the manual of the respective instrument.

For detailed programming instructions regarding the use of the GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR on specific Real-Time PCR instruments please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

RT-PCR Run Settings	
Reaction Volume	20 µL
Ramp Rate	Standard or Fast
Passive Reference	ROX™

Fluorescent Detectors / Fluorophores

Detection of the amplified viral nucleic acid fragment is performed in the detection channels FAM™ (S gene mutation N501Y and A570D) and HEX™ (S gene wildtype N501Y and A570D) with MGBEQ Quencher. Settings for the ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) are given in brackets.

Detection	S Gene Variant	Fluorophore	Quencher
SARS-CoV-2 S gene	N501Y mutation	FAM™	MGBEQ (none)
	N501 wildtype	HEX™ (VIC®)	
	A570D mutation	FAM™	
	A570 wildtype	HEX™ (VIC®)	

Temperature Profile and Data Collection

No. of Cycles	Temperature	Time (min)	Data Collection
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Fluorescence measurement at the end of every cycle

Before starting the test run, please check the settings for cycles, temperature and time.

8. RESULTS

Data analysis should be performed with the software of the used real-time PCR device according to manufacturer's instructions.

Analysis settings:

Setting	Recommendation
Threshold	Enter a value for the threshold so that the threshold is: <ul style="list-style-type: none"> • Above the background • Below the plateau and linear regions of the amplification curve • Within the exponential phase of the amplification curve
Baseline	Select start and end cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.

8.1. Run Validation Criteria

Test run is valid only if RT-PCR run complete.

The NTC Ct values must meet the acceptance criterion in the table below for the assay to be valid.

Only after that sample data may be analyzed and interpreted.

Validation Criteria	Result/Acceptable Ct	Valid/Invalid	Measure
NTC	not detected (ND)	valid	-
	Ct ≤ 40	invalid	Repeat test run

8.2. Interpretation of Results

If test run is valid interpretation of sample results is as follows:

- Positive (POS): Ct ≤ 38
- Negative (neg): Not detected (ND) or Ct > 38

SARS-CoV-2 S gene	Detection Channel	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
wildtype	POS	neg
lineage B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
lineage B.1.351 (N501Y)	POS	POS

Discrimination of virus variants with respect to S gene codons 501 and 570 is only possible for samples

- that have already been pretested positive for the presence of SARS-CoV-2 RNA and
- whose Ct value in one or both of the S gene channels is below Ct ≤ 38

9. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Very low amounts of starting material, e.g. weak positive samples (high Ct values in the previous diagnostic SARS-CoV-2 PCR), can result in GSD NovaType SARS-CoV-2 ID test runs with negative signals. However, such results do not exclude the presence of SARS-CoV-2 RNA.

10. QUALITY CONTROL

In accordance with NovaTec Immundiagnostica GmbH ISO-certified Quality Management System, each lot of GSD NovaType SARS-CoV-2 ID has been tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

11. TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

Registered names, trademarks, etc. used in this document are to be considered protected by law even if not specifically marked as such.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- **FOR RESEARCH USE ONLY. Not for use in diagnostic procedures.**
- All human samples should be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Wear disposable powder-free gloves, a laboratory coat and eye protection when handling specimens.
- Always use DNase/RNase-free disposable reaction tubes and pipette tips with aerosol barriers.
- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the specimen and the components of the kit.
- In order to avoid contamination of working space with nucleic acids, reaction tubes/plates should not be opened after amplification.
- RT-PCR is highly sensitive to nucleic acid contamination. Therefore, positive / potentially positive material must be stored separately from all other components of the kit.
- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- This assay must not be used on the specimen directly.
- Prior to using this assay the nucleic acid has to be extracted with suitable extraction methods from the original specimen.
- Since ethanol is a strong Real-Time PCR inhibitor, it is necessary to completely eliminate it prior to the elution of the nucleic acid during extraction. If using spin columns with washing buffers containing ethanol, it is highly recommended to perform an additional centrifugation step of 10 min at approximately 17000 x g (~ 13000 rpm) before eluting the RNA. For this additional centrifugation step, use a new collection tube.
- The result of this RT-PCR kit may be influenced by potential mutations in the genome of the pathogen if they are located in the primer / probe binding region. Underestimation and/or failure to detect the pathogen may occur.
- RT-PCR inhibitors may also elicit underestimation, false negative results or invalid runs. Therefore, only use nucleic acids extraction kits, which remove RT-PCR inhibitors and which are dedicated for downstream RT-PCR processes.
- The Real-Time PCR is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice and trained in RT-PCR.
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Ende 2019 trat in der Stadt Wuhan, Provinz Hubei, Volksrepublik China, eine neuartige Atemwegserkrankung auf, die sich schon bald innerhalb des Landes und rasch weltweit ausbreitete. Als Erreger wurde das SARS-CoV-2 („Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) identifiziert. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) gehört, wie das eng verwandte SARS-Coronavirus (SARS-CoV), zur Gattung der Betacoronaviren innerhalb der Familie der Coronaviren. Das zoonotische Reservoir des Virus sind vermutlich Fledermäuse.

Coronaviren sind große, von einer Lipidhülle umgebene RNA-Viren mit einzelsträngigem Plus-Strang-Genom, die den Menschen, aber auch eine Vielzahl von Tieren infizieren. Die bekannten humanen Coronaviren NL63, 229E, OC43 und HKU1 sind vor allem in den Wintermonaten weit verbreitet. Bis zu einem Drittel aller akuten Atemwegserkrankungen, typischerweise mit milden Symptomen (Erkältung), werden durch diese Coronaviren verursacht. Bei mehr als 80 % der erwachsenen Bevölkerung lassen sich Antikörper gegen humane Coronaviren nachweisen. Die Immunität gegenüber früheren Infektionen hält nur für eine kurze Zeit an. Reinfektionen mit dem gleichen Erreger sind daher bereits nach einem Jahr möglich.

SARS-CoV-2 wird vorwiegend durch Tröpfcheninfektion über Husten oder Niesen und durch engen Kontakt mit infizierten Personen übertragen. Theoretisch sind auch Schmierinfektionen und Infektionen über die Bindehaut der Augen möglich.

Die Inkubationszeit liegt im Median bei 5-6 Tagen (und maximal bei bis zu 14 Tagen).

Zu den klinischen Manifestationen der SARS-CoV-2-assoziierten COVID-19 Erkrankung zählen Fieber, Husten, Atembeschwerden und Müdigkeit. Bei den meisten Patienten manifestiert sich die Infektion mit Symptomen einer leichten fieberhaften Erkrankung mit irregulären Lungeninfiltraten.

Das ursprüngliche klinische Anzeichen von COVID-19, das eine Diagnose ermöglichte, war eine Lungenentzündung. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Krankheitsverlauf unspezifisch ist und stark variiert: von asymptomatischen Verläufen bis hin zu einer schweren Lungenentzündung mit Lungenversagen und Tod. Nach heutigem Kenntnisstand sind jedoch etwa 80 % der Erkrankungen leicht bis moderat.

Obwohl schwere Krankheitsverläufe auch bei jüngeren Patienten und Menschen ohne Vorerkrankungen auftreten, haben folgende Personengruppen ein erhöhtes Risiko für schwere Erkrankungsformen: ältere Menschen (mit einem stetig steigenden Risiko ab etwa 50-60 Jahren), Raucher und Menschen mit bestimmten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems oder der Lunge, Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, Krebs oder Patienten mit einem geschwächten Immunsystem (z.B. durch Immunschwäche oder durch die Einnahme von Medikamenten, die das Immunsystem unterdrücken).

Die Behandlung beschränkt sich auf unterstützende Maßnahmen in Abhängigkeit vom Schweregrad des Krankheitsbildes (z.B. Sauerstoffgabe, Flüssigkeitsmanagement etc.) sowie auf die Behandlung relevanter Grunderkrankungen. Verschiedene spezifische Therapieansätze (direkt antiviral, immunmodulatorisch wirksam) wurden und werden im Verlauf der SARS-CoV-2-Pandemie im Rahmen von Studien untersucht.

Ende 2020 wurden zwei COVID-19 Varianten identifiziert, die Mutationen an unterschiedlichen Positionen des S Gens aufweisen, das für das Spike Protein kodiert. Einige dieser Mutationen führen zu einer höheren Infektiosität. Insbesondere die Mutation N501Y wird als eine Ursache hierfür angesehen. Diese Mutation findet sich in Virusisolaten in Großbritannien (UK), Linie B.1.1.7, und in Südafrika, Linie B.1.351. Diese beiden Varianten können durch die Mutation A570D unterschieden werden, die zusätzlich nur in der Variante aus UK auftritt.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
SARS-CoV-2 („Schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“)	COVID-19	Der Krankheitsverlauf ist unspezifisch, vielfältig und variiert stark, von asymptomatischen Verläufen bis hin zu schwerer Lungenentzündung mit Lungenversagen und Tod	Primärer Übertragungsweg: Tröpfcheninfektion; Schmierinfektionen und Infektionen über die Bindehaut der Augen sind theoretisch möglich

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT): z.B. RT-PCR
- Serologie: Nachweis von Antikörpern durch z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK (NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE!)

Der GSD NovaType SARS-CoV-2 ID ist ein Real-Time Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktions-Assay (RT-PCR) nur für Forschungszwecke, der für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis und die Unterscheidung der SARS CoV-2 („Schweres Akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) S Gen-Varianten Wildtyp und Mutationen N501Y und A570D entwickelt wurde. Als Probenmaterial sollte genomische RNA verwendet werden, die aus humanen respiratorischen Proben (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngeal-spülung/-abstrich, Oropharyngealabstrich, bronchoalveoläre Lavage und Gurgellösung) extrahiert wurde und die zuvor mit diagnostischen RT-PCR-Methoden z.B. dem GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) positiv auf SARS-CoV-2 RNA getestet wurde. Die GSD NovaType SARS-CoV-2 ID ist ausdrücklich nicht für die Diagnose einer SARS-CoV-2 Infektion und nicht für den Einsatz in diagnostischen Verfahren vorgesehen. Sie soll lediglich Untersuchungen zur Prävalenz und Häufigkeit von Virusvarianten unterstützen.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative Bestimmung spezifischer RNA basiert auf der Real-Time Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktions-Technologie (RT-PCR). Der Kit enthält spezifische Primer und Sonden, die mit fluoreszierenden Reporter- und Quencher-Farbstoffen zur Amplifikation und zum gleichzeitigen Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen, die **spezifische SARS-CoV-2 S Gen-Varianten** repräsentieren, markiert sind.

Die für das zu detektierende Gen spezifischen Sonden sind mit den Fluorophoren HEXTM und FAMTM markiert und ermöglichen so die parallele Unterscheidung zwischen dem Wildtyp S Gen und den Mutationen N501Y und A570D.

Die GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR wurde für die folgenden Real-Time PCR Plattformen validiert:

- ABI Prism[®] 7500 SDS (Applied BiosystemsTM)
- ABI Prism[®] 7500 Fast SDS (Applied BiosystemsTM)
- AriaMxTM (Agilent Technologies)
- AriaDxTM (Agilent Technologies)

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Anzahl Röhren	Volumen pro Röhren [µL]
grün	E-MIX	RT-PCR Enzym-Mix (Reverse Transkriptase, Hot-Start DNA Polymerase, Rnase-Inhibitor, Nukleotide, Magnesium and Stabilisatoren in Puffer)	1 (4)	550
blau/weiß	PP VAR	Primer-Probe-Mix (zur Unterscheidung von Varianten)	1 (4)	350

4.2. Erforderliche Materialien und Geräte, nicht mitgeliefert

- Deionisiertes nukleasefreies und nukleinsäurefreies Wasser
- Real-Time PCR-Gerät (für bereits validierte Geräte siehe 3. TESTPRINZIP)
- Alternative Real-Time PCR-Geräte können ebenfalls geeignet sein. Deren Eignung für die Verwendung mit dem GSD NovaType SARS CoV-2 ID muss vom Anwender validiert werden.
- Geeignete Real-Time PCR-Verbrauchsmaterialien (z.B. Plastikröhren für den einmaligen Gebrauch Reaktionsplatten, entsprechende optische Verschlussmaterialien)
- Tisch-Mikrozentrifuge
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer
- Einstellbare Pipetten abhängig vom Reaktions-Setup
- DNase/RNase-freie Einweg-Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einweghandschuhe

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Der GSD NovaType SARS-CoV-2 ID Kit wird auf Trockeneis versandt und alle Komponenten sollten in gefrorenem Zustand ankommen.

- Alle Komponenten müssen unmittelbar nach Ankunft bei -20 °C gelagert werden.
- Wiederholte Einfrier-Auftauzyklen (mehr als zwei) der Reagenzien sollten vermieden werden, da dies die Leistung des Kits beeinträchtigen könnte. Reagenzien sollten aliquotiert eingefroren werden, wenn sie in Abständen verwendet werden.
- Lagerung in aufgetautem Zustand (z.B. Lagerung auf Eis) so kurz wie möglich halten.
- **E-MIX** und **PP VAR** bis zur Verwendung tiefgekühlt aufbewahren.
- **E-MIX** und **PP VAR** vor Licht schützen.

6. VORBEREITUNG DER PROBEN

- Extrahierte RNA oder Gesamtnukleinsäure aus humanen respiratorischen Proben (nasale Lavage/Abstrich, nasopharyngeale Lavage/Abstrich, oropharyngealer Abstrich, bronchoalveoläre Lavage und Gurgellösung), die zuvor mittels RT-PCR-Methoden, z.B. GSD NovaPrime[®] SARS-CoV-2 (COVID-19) positiv auf SARS-CoV-2 RNA getestet wurde, ist das Ausgangsmaterial für die GSD NovaType SARS CoV-2 ID.
- Die Qualität der extrahierten RNA hat einen entscheidenden Einfluss auf die Leistung des gesamten RT-PCR-Testsystems. Stellen Sie sicher, dass die Nukleinsäureextraktionsmethode mit der Real-Time PCR-Technologie kompatibel ist.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

7.1. Reaktions-Setup

- Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung **vor** der Durchführung des Assays sorgfältig durch. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von der strikten Befolgung der Gebrauchsanweisung ab.
- Stellen Sie vor Gebrauch sicher, dass alle Reagenzien vollständig aufgetaut, durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen gemischt und kurz zentrifugiert worden sind.
- Wichtig: Der **E-MIX** ist zähflüssig. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz ab, um sicherzustellen, dass sich kein Material im Deckel oder an der Seite des Röhrchens abgesetzt hat. Achten Sie darauf, vorsichtig zu pipettieren und zu dispensieren, und verwenden Sie Pipettenspitzen, die für das Pipettieren viskoser Flüssigkeiten geeignet sind.
- Die Verwendung von deionisiertem nuklease- und nukleinsäurefreiem Wasser als „No Template Control“ (NTC) wird dringend empfohlen.
- Definieren Sie die Positionen (Vertiefungen) für Proben und Kontrollen (NTC) auf der Platte.

Reaktions-Setup	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Probe oder NTC	12 µL
Gesamtvolumen	20 µL

- Verschließen Sie die optische 96-Well-Reaktionsplatte mit dem entsprechenden optischen Verschlussmaterial.
- Zentrifugieren Sie die optische Reaktionsplatte in einer Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten für 60 Sekunden bei etwa 1000 x g (~ 3000 U/min).

7.2. Programmierung des Real-Time PCR-Geräts

Für die Konfiguration und Programmierung des Real-Time PCR-Geräts nehmen Sie bitte das jeweilige Handbuch zu Hilfe.

Für detaillierte Anweisungen zur Programmierung spezifischer Real-Time PCR-Geräte zur Verwendung der GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR, wenden Sie sich bitte an NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Einstellungen RT-PCR Lauf	
Reaktionsvolumen	20 µL
Ramp Rate	Standard oder Fast
Passive Referenz	ROX™

Fluoreszenz-Detektoren / Fluorophore

Die Detektion des amplifizierten viralen Nukleinsäurefragments erfolgt in den Detektionskanälen FAM™ (Mutation S Gen N501Y und A570D) und HEX™ (Wildtyp S Gen N501Y und A570D) mit MGBEQ Quencher. Einstellungen für den ABI Prism® 7500 SDS/ Fast SDS (Applied Biosystems™) sind in Klammern angegeben.

Detektion	Variante S Gen	Fluorophor	Quencher
SARS-CoV-2 S Gen	N501Y Mutation	FAM™	MGBEQ (kein)
	N501 Wildtyp	HEX™ (VIC®)	
	A570D Mutation	FAM™	
	A570 Wildtyp	HEX™ (VIC®)	

Temperaturprofil und Datenerfassung

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus

Überprüfen Sie bitte die Einstellungen für Zyklen, Temperatur und Zeit bevor Sie den Testlauf starten.

8. ERGEBNISSE

Die Datenanalyse sollte mit der Software des verwendeten Real-Time PCR-Gerätes gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt werden.

Analyse-Einstellungen:

Einstellung	Empfehlung
Schwellenwert	Geben Sie einen Wert für den Schwellenwert ein, so dass für den Schwellenwert gilt: <ul style="list-style-type: none">• Oberhalb des Hintergrunds• Unterhalb des Plateaus und der linearen Bereiche der Amplifikationskurve• Innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve
Basislinie	Wählen Sie Start- und Endzykluswerte so, dass die Basislinie endet bevor eine signifikante Fluoreszenz detektiert wird.

8.1. Testgültigkeitskriterien

Der Testlauf ist nur gültig, wenn der RT-PCR Testlauf abgeschlossen ist.

Die Ct-Werte der NTC müssen die Akzeptanzkriterien in der nachstehenden Tabelle erfüllen, damit der Test gültig ist.

Erst danach dürfen Probandaten analysiert und interpretiert werden.

Validierungskriterien	Ergebnis/zulässiger Ct	Valide/Invalide	Maßnahme
NTC	nicht detektiert (ND)	valide	-
	Ct ≤ 40	invalide	Testlauf wiederholen

8.2. Interpretation der Ergebnisse

Wenn der Testlauf gültig ist, werden die Probenergebnisse wie folgt interpretiert:

- Positiv (POS): Ct ≤ 38
- Negativ (neg): nicht detektiert (ND) oder Ct > 38

SARS-CoV-2 S Gen	Detektionskanal	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
Wildtyp	POS	neg
Linie B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
Linie B.1.351 (N501Y)	POS	POS

Die Unterscheidung der Virusvarianten in Bezug auf die S Gen Codons 501 und 570 gilt nur für Proben,

- die bereits positiv auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA getestet wurden und
- deren Ct-Wert in einem oder beiden der S Gen Detektionskanäle unter Ct ≤ 38 liegt

9. GRENZEN DES VERFAHRENS

Sehr geringe Mengen an Ausgangsmaterial, z.B. schwach positive Proben (hohe Ct-Werte in der vorangegangenen diagnostischen SARS-CoV-2 PCR), können zu GSD NovaType SARS-CoV-2 ID Testläufen mit negativen Signalen führen. Solche Ergebnisse schließen jedoch das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA nicht aus.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der NovaTec Immundiagnostica GmbH ist jede Charge des GSD NovaType SARS-CoV-2 ID Assays gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

11. MARKENZEICHEN UND HAFTUNGS AUSSCHLÜSSE

Die in diesem Dokument verwendeten eingetragenen Namen, Markenzeichen usw. sind als gesetzlich geschützt zu betrachten, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- **NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.**
- Alle Humanproben sollten als potentiell infektiös betrachtet und behandelt werden.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Reagenzien nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Beim Umgang mit Proben puderfreie Einweghandschuhe, einen Laborkittel und einen Augenschutz tragen.
- Verwenden Sie immer DNase/RNase-freie Einwegreaktionsgefäße und Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle und Nuklease- (DNase/RNase) Kontamination der Probe und der Kit-Komponenten.
- Um eine Kontamination des Arbeitsbereichs mit Nukleinsäuren zu vermeiden, dürfen Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht geöffnet werden.
- Die RT-PCR ist hochempfindlich gegenüber Nukleinsäurekontaminationen. Daher muss positives/potenziell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits gelagert werden.
- Belassen Sie Verbrauchsmaterial und Ausstattung in den eindeutig zugewiesenen, getrennten Arbeitsbereichen.
- Dieser Assay darf nicht direkt mit der Patientenprobe verwendet werden.
- Vor der Verwendung dieses Assays muss die Nukleinsäure mit geeigneten Extraktionsmethoden aus der Originalprobe extrahiert werden.
- Da Ethanol ein starker Inhibitor der Real-Time PCR ist, muss es vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig eliminiert werden. Bei Verwendung von Spin Columns mit Waschpuffern, die **Ethanol enthalten**, wird dringend empfohlen, vor der Elution der RNA einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von 10 min bei ca. 17000 x g (~ 13000 U/min) durchzuführen. Für diesen zusätzlichen Zentrifugationsschritt ist ein neues Sammelröhrchen zu verwenden.
- Das Ergebnis dieses RT-PCR-Kits kann durch potenzielle Mutationen im Genom des Erregers beeinflusst werden, wenn diese in der Primer-/Sondenbindungsregion liegen. Dies kann zu einer Fehleinschätzung führen und/oder den Erregernachweises erschweren.
- RT-PCR-Inhibitoren können eine zu niedrige Bewertung, falsch negative Ergebnisse oder ungültige Testläufe hervorrufen. Verwenden Sie daher nur Nukleinsäure-Extraktionskits, die RT-PCR-Inhibitoren entfernen und die für nachgeschaltete RT-PCR-Prozesse bestimmt sind.
- Die Real-Time PCR ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das mit der guten Laborpraxis vertraut und in RT-PCR geschult ist.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 Bestimmungen)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 Determinations)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Fin 2019, une nouvelle maladie respiratoire est apparue dans la ville de Wuhan, dans la province de Hubei de la République populaire de Chine, et s'est rapidement répandue dans le pays et dans le monde. L'agent causal a été identifié comme étant le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Le CoV-2 du SARS (2019-nCoV), comme le coronavirus du SARS (CoV du SARS) qui lui est étroitement apparenté, appartient au genre Beta-coronavirus dans la famille des coronavirus. Le réservoir zoonotique du virus semble être les chauves-souris.

Les coronavirus sont des virus à ARN monocaténaire enveloppés et positifs qui infectent les humains, mais aussi un large éventail d'animaux. Les coronavirus humains communs NL63, 229E, OC43 et HKU1 sont très répandus, surtout pendant les mois d'hiver. Ils sont responsables de jusqu'à un tiers de toutes les maladies respiratoires aiguës, généralement accompagnées de symptômes légers (rhume). Plus de 80 % de la population adulte possède des anticorps contre les coronavirus humains. L'immunité contre les infections précédentes ne dure qu'une courte période. Par conséquent, il est possible de réinfecter le même agent pathogène juste après un an.

Le SARS-CoV-2 se transmet principalement par l'infection des gouttelettes par la toux ou les éternuements et par contact étroit avec des patients infectés. En théorie, l'infection par frottis et l'infection par la conjonctive des yeux sont également possibles.

La période d'incubation est de 5 à 6 jours en moyenne (et jusqu'à 14 jours au maximum).

Les manifestations cliniques de la maladie COVID-19 liée au SARS-CoV-2 comprennent la fièvre, la toux, les problèmes respiratoires et la fatigue. Chez la plupart des patients, l'infection se manifeste par des symptômes d'une maladie fébrile légère avec des infiltrats pulmonaires irréguliers.

Le premier signe clinique de la COVID-19 qui a permis de détecter le cas était une pneumonie. Mais il s'est avéré que l'évolution de la maladie est non spécifique et très variable, allant d'une évolution asymptomatique à une pneumonie grave avec insuffisance pulmonaire et décès. Cependant, selon les connaissances actuelles, environ 80 % des maladies sont légères à modérées.

Bien que des évolutions graves de la maladie se produisent également chez des patients plus jeunes et des personnes sans antécédents de maladie, les groupes de personnes suivants présentent un risque accru de formes graves de la maladie: les personnes âgées (avec un risque en augmentation constante à partir de 50 à 60 ans environ), les fumeurs et les personnes souffrant de certaines maladies du système cardiovasculaire ou des poumons, les patients souffrant de maladies chroniques du foie, de diabète sucré, de cancer, ou les patients dont le système immunitaire est affaibli (par exemple en raison de déficiences immunitaires ou de la prise de médicaments qui suppriment le système immunitaire).

Le traitement se concentre sur les mesures de soutien optimales en fonction de la gravité du tableau clinique (par exemple, l'administration d'oxygène, compensation de l'équilibre hydrique, etc.) ainsi que sur le traitement des maladies sous-jacentes pertinentes. Diverses approches thérapeutiques spécifiques (directement efficaces sur le plan antiviral, efficaces sur le plan immunomodulateur) ont été et sont actuellement étudiées dans le cadre d'études menées au cours de la pandémie de SRAS-CoV-2.

Fin 2020, deux variantes de COVID-19 ont été identifiées qui présentent des mutations dans différentes positions du gène S, codant pour la protéine de pointe. Certaines de ces mutations entraînent une infectiosité plus élevée. En particulier, la mutation N501Y est identifiée comme l'une des causes fondamentales. Cette mutation se trouve dans des isolats de virus au Royaume-Uni (UK), lignée B.1.1.7, et en Afrique du Sud, lignée B.1.351. Ces deux variantes peuvent être distinguées par la mutation A570D, qui n'est en outre présente que dans la variante provenant du Royaume-Uni.

Espèce	La Maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de Transmission
SARS-CoV-2 (coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère)	COVID-19	L'évolution de la maladie est non spécifique, diverse et très variable, allant d'une évolution asymptomatique à une pneumonie grave avec insuffisance pulmonaire et décès.	Primaire: infection par gouttelettes; les infections par frottis et les infections par la conjonctive des yeux sont théoriquement possibles.

L'identification de l'agent pathogène ou d'une infection peut se faire par:

- Technique d'amplification des acides nucléiques (TAN): par exemple RT-PCR
- Sérologie: détection des anticorps par exemple par ELISA

2. INDICATION D'UTILISATION (UNIQUEMENT POUR LA RECHERCHE)

Le GSD NovaType SARS-CoV-2 ID est un test PCR de transcription inverse en temps réel à usage uniquement pour la recherche (RUO) destiné pour la détection qualitative et la discrimination simultanée des variantes du gène S du SARS-CoV-2 (syndrome respiratoire aigu sévère coronavirus 2) de type sauvage, et des mutations N501Y et A570D. Les échantillons doivent être constitués d'ARN génomique extrait de types d'échantillons respiratoires humains (lavage/écouvillon nasal, lavage/écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé, lavage bronchoalvéolaire et solution de gargarisme) qui ont préalablement été testés positifs pour l'ARN du SRAS-CoV-2 par des méthodes de diagnostic RT-PCR, par exemple GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19). Le GSD NovaType SARS-CoV-2 ID n'est expressément pas destiné au diagnostic de l'infection par le SARS-CoV-2 et ne doit pas être utilisé dans les procédures de diagnostic. Il est uniquement destiné pour faciliter les enquêtes relatives à la prévalence et à la fréquence des variantes du virus.

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination qualitative de l'ARN spécifique est basée sur la technologie de l'amplification en chaîne par polymérase (RT PCR) à transcription inverse en temps réel. Le kit contient des amorces et des sondes spécifiques marquées avec des colorants fluorescents rapporteurs et extincteurs pour l'amplification et la détection simultanée de séquences d'ARN spécifiques qui représentent des **variantes spécifiques du gène-S du SARS-CoV-2**.

Les sondes spécifiques du gène d'intérêt sont marquées avec les fluorophores HEX™ et FAM™, permettant ainsi une discrimination parallèle entre le gène S de type sauvage et les mutations N501Y et A570D.

La GSD NovaType SARS-CoV-2 ID est validée pour les plateformes PCR en temps réel suivantes:

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems™)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- AriaDx™ (Agilent Technologies)

4. MATERIEL

4.1. Réactifs Fournis

Bouchon	Symbole	Composante	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Nombre de Flacons	Volume par Flacon [µL]
verte	E-MIX	Mix d'Enzymes RT-PCR (Transcriptase inverse, ADN polymérase à démarrage à chaud, inhibiteur de RNase, nucléotides, magnésium, stabilisateurs et tampon)	1(4)	550
bleu/blanc	PP VAR	Primer-Probe-Mix (pour la discrimination des variantes)	1(4)	350

4.2. Matériel et Équipement nécessaires, mais non fournis

- Eau déionisée sans nucléase et sans acide nucléique
- Instrument PCR en temps réel (pour les instruments déjà validés, voir 3. PRINCIPE DU TEST).
- D'autres instruments de PCR en temps réel pourraient également être appropriés. Leur adéquation pour être utilisé avec le GSD NovaType SARS-CoV-2 ID doit être validée par l'utilisateur.
- Matériel consommable appropriés pour la PCR en temps réel (par exemple, tubes jetables, plaques de réaction, matériaux de fermeture optique correspondants)
- Micro centrifugeuse de table
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitration
- Mix vortex
- Pipettes ajustables en fonction du réglage de la réaction
- Embouts de pipette jetables sans DNase/RNase avec filtres
- Gants jetables sans poussière

5. STABILITE ET CONSERVATION

Le kit GSD NovaType SARS-CoV-2 ID est expédié sur glace sèche et tous les composants doivent arriver congelés.

- Tous les composants doivent être stockés à entre -30 °C et -15 °C immédiatement après leur arrivée.
- Les cycles répétés de gel-dégel (plus de deux) des réactifs doivent être évités, car cela pourrait affecter la performance du kit. Les réactifs doivent être congelés en aliquotes s'ils sont utilisés de manière intermittente.
- Le stockage non congelé (par exemple, le stockage sur glace) doit être aussi court que possible.
- Conservez le **E-MIX** et le **PP | VAR** au congélateur, jusqu'à ce que vous soyez prêt à l'utiliser.
- Protégez le **E-MIX** et le **PP | VAR** de la lumière.

6. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- L'ARN extrait ou acide nucléique total extrait de types d'échantillons respiratoires humains (lavage/écouvillon nasal, lavage/écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé, lavage bronchoalvéolaire et solution de gargarisme) préalablement testés positifs pour l'ARN du SARS-CoV-2 par des méthodes de RT-PCR; par exemple, le GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) est le matériel de départ du GSD NovaType SARS-CoV-2 ID.
- La qualité de l'ARN extrait a un effet crucial sur la performance de l'ensemble du système de test RT-PCR. Assurez-vous que la méthode d'extraction des acides nucléiques est compatible avec la technologie PCR en temps réel.

7. PROCÉDE DE TESTE

7.1. Préparation de la Réaction

- Veuillez lire attentivement le mode d'emploi **avant** d'effectuer le test. La fiabilité des résultats dépend du strict respect du mode d'emploi.
- Avant l'utilisation, assurez-vous que tous les échantillons et réactifs sont complètement décongelés, mélangés à la pipette ou au vortex et centrifugés brièvement.
- Important: **E-MIX** est visqueux. Faites tourner brièvement le tube pour vous assurer que la matière ne s'est pas logée dans le bouchon ou sur le côté du tube. Veillez à pipeter et à distribuer avec soin, et utilisez des embouts de pipette adaptés au pipetage de liquides visqueux.
- L'utilisation d'eau sans nucléase et sans acide nucléique comme „No Template Control“ (NTC, contrôle sans gabarit) est fortement recommandée.
- Définissez les positions (puits) des échantillons et des contrôles (NTC) sur la plaque.

Préparation de la Réaction	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Echantillon ou NTC	12 µL
Volume total	20 µL

- Fermer la plaque de réaction optique avec le matériau de fermeture optique correspondant.
- Centrifuger la plaque de réaction optique dans une centrifugeuse avec un rotor pour plaques de microtitration pendant 60 secondes à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

7.2. Programmation des Instruments de PCR en Temps Réel

En ce qui concerne la configuration et la programmation de l'instrument PCR en temps réel, veuillez utiliser le manuel de l'instrument concerné.

Pour des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation de la GSD NovaType SARS-CoV-2 ID sur des instruments spécifiques de PCR en temps réel, veuillez contacter NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Paramètres d'Exécution RT-PCR	
Volume des Réaction	20 µL
Ramp Rate	Standard ou Fast
Référence Passive	ROX™

Détecteurs Fluorescents / Fluorophore

La détection du fragment d'acide nucléique viral amplifié est effectuée dans les canaux de détection FAM™ (mutation du gène S N501Y et A570D) et HEX™ (gène S de type sauvage N501Y et A570D) avec le Quencher MGBEQ. Les paramètres de l'ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) sont indiqués entre parenthèses.

Détecteur	Variante du Gène S	Fluorochrome	Quencher
SARS-CoV-2 Gene S	N501Y mutation	FAM™	MGBEQ (aucun)
	N501 type sauvage	HEX™ (VIC®)	
	A570D mutation	FAM™	
	A570 type sauvage	HEX™ (VIC®)	

Profil de Température et Collecte de Données

No. de Cycles	Température	Durée (min)	Collecte de Données
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle

Avant de commencer l'essai, veuillez vérifier les réglages des cycles, de la température et de la durée.

8. RÉSULTATS

L'analyse des données doit être effectuée avec le logiciel de l'appareil PCR en temps réel utilisé, conformément aux instructions du fabricant.

Paramètres d'analyse:

Paramètres	Recommandation
Seuil	Indiquez une valeur pour le seuil afin que le seuil soit: <ul style="list-style-type: none">• Au-dessus du fond• Sous le plateau et les régions linéaires de la courbe d'amplification• Dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification
Ligne de base	Sélectionnez les valeurs de début et de fin de cycle de sorte que la ligne de base se termine avant qu'une fluorescence importante ne soit détectée.

8.1. Critères de Validation des Tests

Le test n'est valable que si l'exécution de la RT-PCR est terminée.

Pour que le test soit valide, les valeurs de Ct du CTN doivent répondre au critère d'acceptation du tableau ci-dessous.

Ce n'est qu'après cela que les données de l'échantillon peuvent être analysées et interprétées.

Critères de Validation	Résultat/Seuil (Ct) acceptable	Valide/Non valide	Mesure
NTC	non détecté (ND)	valide	-
	Ct ≤ 40	non valide	Répéter le test

8.2. Interprétation des Résultats

Si le test est valable, l'interprétation des résultats de l'échantillon est la suivante:

- Positif (POS): Ct ≤ 38
- Négatif (neg): non détecté (ND) ou Ct > 38

SARS-CoV-2 S Gen	Canal de Détection	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
type sauvage	POS	neg
lignée B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
lignée B.1.351 (N501Y)	POS	POS

La discrimination des variantes du virus par rapport aux codons 501 et 570 du gène S n'est possible que pour les échantillons

- qui ont déjà fait l'objet de tests préliminaires positifs pour la présence de l'ARN du SARS-CoV-2 et
- dont la valeur du Ct dans l'un ou les deux canaux du gène S est inférieure à Ct ≤ 38

9. LES LIMITES DE LA PROCÉDURE

De très faibles quantités de matériel initial, par exemple des échantillons faiblement positifs (valeurs élevées de Ct dans le précédent diagnostic par PCR du SARS-CoV-2), peuvent donner lieu à des tests GSD NovaType SARS-CoV-2 ID avec des signaux négatifs. Toutefois, de tels résultats n'excluent pas la présence d'ARN du SARS-CoV-2.

10. CONTRÔLE QUALITÉ

Conformément au protocole de gestion de certifié qualité ISO de NovaTec Immundiagnostica GmbH, chaque lot de GSD NovaType SARS-CoV-2 ID a été testé par rapport à des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité de produit constante.

11. MARQUES DE COMMERCE ET CLAUSES DE NON-RESPONSABILITÉ

Les noms enregistrés, marques, etc. utilisés dans ce document doivent être considérés comme protégés par la loi même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- **UNIQUEMENT POUR LA RECHERCHE. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.**
- Tous les échantillons d'origine humaine doivent être considérés et manipulés comme potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots de production.
- Aucun réactif d'autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit de test.
- N'utilisez pas de réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Portez des gants jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons.
- Utilisez toujours des tubes de réaction jetables DNase/RNase free et des embouts de pipette avec des barrières anti-aérosols.
- Évitez toute contamination microbienne et par les nucléases (DNase/RNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Afin d'éviter la contamination de l'espace de travail par des acides nucléiques, les tubes de réaction/ plaques ne doivent pas être ouverts après l'amplification.
- La RT-PCR est très sensible à la contamination par les acides nucléiques. Par conséquent, le matériel positif / potentiellement positif doit être stocké séparément de tous les autres composants du kit.
- Consacrez les fournitures et les équipements aux zones de travail séparées et ne les déplacez pas d'une zone à l'autre.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon.
- Avant d'utiliser ce test, l'acide nucléique doit être extrait de l'échantillon original par des méthodes d'extraction appropriées. Il est essentiel de suivre les informations contenues dans le mode d'emploi du kit d'extraction, en particulier en ce qui concerne les différents matériaux d'échantillon!
- Comme l'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique lors de l'extraction. Si l'on utilise des colonnes d'essorage avec des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire de 10 min à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min) avant d'éluer l'ARN. Pour cette étape de centrifugation supplémentaire, utilisez un nouveau tube de collecte.
- Le résultat de ce kit RT-PCR peut être influencé par des mutations potentielles du génome de l'agent pathogène si elles sont situées dans la région de liaison amorce/sonde. Il peut y avoir sous-estimation et/ou non-détection de l'agent pathogène.
- Les inhibiteurs de la RT-PCR peuvent également entraîner une sous-estimation, des résultats faussement négatifs ou des passages non valides. C'est pourquoi il convient de n'utiliser que des kits d'extraction d'acides nucléiques, qui éliminent les inhibiteurs de la RT-PCR et qui sont destinés aux processus RT-PCR en aval.
- La PCR en temps réel est uniquement conçue pour le personnel qualifié qui est familier avec les bonnes pratiques de laboratoire et formé à la RT-PCR.
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

12.1. Elimination des Déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Numéro de Produit:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 déterminations)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 déterminations)

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Alla fine del 2019, una nuova malattia respiratoria è emersa nella città di Wuhan, nella provincia di Hubei della Repubblica Popolare Cinese, e si è presto diffusa rapidamente nel paese e in tutto il mondo. L'agente causale è stato identificato come coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2). La SARS-CoV-2 (2019-nCoV), come il coronavirus della SARS strettamente correlato (SARS-CoV), appartiene al genere Betacoronavirus all'interno della famiglia dei coronavirus. Il serbatoio zoonotico del virus sembra essere costituito da pipistrelli.

I coronavirus sono avvolti, positivi ai virus RNA di grandi dimensioni a singolo filamento che infettano l'uomo, ma anche una vasta gamma di animali. I comuni coronavirus umani NL63, 229E, OC43 e HKU1 sono diffusi soprattutto nei mesi invernali. Sono responsabili fino a un terzo di tutte le malattie respiratorie acute, tipicamente con sintomi lievi (comune raffreddore). Più dell'80 % della popolazione adulta ha anticorpi contro i coronavirus umani. L'immunità da precedenti infezioni dura solo per un breve periodo di tempo. Pertanto, le reinfezioni con lo stesso agente patogeno sono possibili solo dopo un anno.

La SARS-CoV-2 è trasmessa prevalentemente tramite infezione da goccioline attraverso tosse o starnuti e attraverso il contatto ravvicinato con i pazienti infetti. In teoria, sono possibili anche infezioni da striscio e infezioni attraverso la congiuntiva degli occhi. Il periodo di incubazione è nella mediana 5-6 giorni (e fino a 14 giorni al massimo).

Le manifestazioni cliniche della malattia COVID-19 legata alla SARS-CoV-2 includono febbre, tosse, problemi respiratori e affaticamento. Nella maggior parte dei pazienti l'infezione si manifesta con sintomi di una lieve malattia febbrile con infiltrazioni polmonari irregolari.

Il segno clinico iniziale di COVID-19 che ha permesso la rilevazione del caso è stata la polmonite. Ma si è scoperto che il decorso della malattia non è specifico e varia ampiamente, dai decorsi asintomatici alla polmonite grave con insufficienza polmonare e morte. Tuttavia, sulla base delle conoscenze attuali, circa l'80 % delle malattie sono da lievi a moderate.

Sebbene i decorsi gravi della malattia si verificano anche in pazienti più giovani e in persone senza una precedente malattia, i seguenti gruppi di persone hanno un rischio maggiore di forme gravi della malattia: anziani (con un rischio in costante aumento a partire dai 50-60 anni circa), fumatori e persone con determinate malattie del sistema cardiovascolare o dei polmoni, pazienti con malattie croniche del fegato, diabete mellito, cancro o pazienti con un sistema immunitario indebolito (ad es. a causa di carenze immunitarie o con l'assunzione di farmaci che sopprimono il sistema immunitario).

Il trattamento si concentra su misure di supporto a seconda della gravità del quadro clinico (ad es. somministrazione di ossigeno, gestione del bilancio dei liquidi, ecc. Vari approcci terapeutici specifici (direttamente antivirali efficaci, immunomodulatori efficaci) sono stati e sono oggetto di studi nel corso della pandemia di SARS-CoV-2.

Alla fine del 2020 sono state identificate due varianti di COVID-19 che presentano mutazioni in diverse posizioni del gene S, che codifica per la proteina spike. Alcune di queste mutazioni comportano una maggiore infettività. In particolare la mutazione N501Y è identificata come una delle cause principali. Questa mutazione si trova in isolati del virus nel Regno Unito (UK), lignaggio B.1.1.7, e in Sud Africa, lignaggio B.1.351. Queste due varianti possono essere distinte dalla mutazione A570D che è presente solo nella variante del Regno Unito.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
SARS-CoV-2 (sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2)	COVID-19	Il decorso della malattia è aspecifico, vario e varia notevolmente, da decorsi asintomatici a polmonite grave con insufficienza polmonare e morte	Modalità di trasmissione primaria: infezione da goccioline; le infezioni da striscio e le infezioni attraverso la congiuntiva degli occhi sono teoricamente possibili

L'infezione o la presenza di un agente patogeno può essere identificata da:

- Tecniche di amplificazione dell'acido nucleico (NAT): ad esempio RT-PCR
- Sierologia: individuazione di anticorpi mediante, ad esempio, ELISA

2. USO PREVISTO (SOLO DI RICERCA)

Il GSD NovaType SARS-CoV-2 ID è un test PCR di trascrizione inversa in tempo reale per uso esclusivo della ricerca (RUO) progettato per il rilevamento qualitativo simultaneo e la discriminazione delle varianti del gene S del coronavirus SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), delle varianti tipo selvatico e mutazioni N501Y e A570D. Il materiale del campione deve essere RNA genomico estratto da campioni respiratori umani (lavaggio/smalto nasale, lavaggio/smalto nasofaringeo, tampone orofaringeo, lavaggio broncoalveolare e soluzione per gargarismi) che sono stati precedentemente testati come risultati positivi per RNA di SARS-CoV-2 con metodi diagnostici RT-PCR, ad esempio GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19). Il GSD NovaType SARS-CoV-2 ID non è espressamente destinato alla diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2 e non deve essere utilizzato nelle procedure diagnostiche. È stato progettato solo per aiutare le indagini relative alla prevalenza e alla frequenza delle varianti del virus.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa dell'RNA specifico si basa sulla tecnologia della reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa in tempo reale (RT PCR). Il kit contiene primer e sonde specifiche marcate con coloranti fluorescenti reporter e quencher per l'amplificazione e la rilevazione simultanea di specifiche sequenze di RNA che rappresentano specifiche **varianti del gene S SARS-CoV-2**.

Le sonde specifiche del gene di interesse sono marcate con i fluorofori HEXTM e FAMTM, permettendo così la discriminazione parallela tra il gene S di tipo selvaggio e le mutazioni N501Y e A570D.

La GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR è stata convalidata per le seguenti piattaforme di PCR in tempo reale:

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied BiosystemsTM)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied BiosystemsTM)
- AriaMxTM (Agilent Technologies)
- AriaDxTM (Agilent Technologies)

4. MATERIALI

4.1. Reagenti Forniti

Tappo	Simbolo	Componente	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Nombre de Flacons	Volume par Flacon [µL]
verde	E-MIX	RT-PCR Mix di Enzima (trascrittasi inversa, DNA polimerasi a caldo, inibitore della RNasi, nucleotidi, magnesio, stabilizzatori)	1(4)	550
blu/bianco	PP VAR	Primer-Probe-Mix (per la discriminazione delle varianti)	1(4)	350

4.2. Materiali e Attrezzature necessari, non forniti

- Acqua deionizzata senza nucleasi e senza acidi nucleici
- Strumento Real-in tempo reale PCR (per gli strumenti già convalidati fare riferimento a 3. PRINCIPIO DEL TEST)
Strumenti alternativi di PCR in tempo reale potrebbero anche essere appropriati. La loro idoneità all'uso con il GSD NovaType SARS-CoV-2 ID deve essere convalidata dall'utente.
- Adeguati materiali di consumo per PCR in tempo reale (ad es. provette monouso, piastre di reazione, corrispondenti materiali di chiusura ottici)
- Microcentrifuga da tavolo
- Centrifuga con rotore per Piastre di Microtitolazione
- Miscelatore a vortice
- Pipette regolabili riguardo alla configurazione della reazione
- Puntali per pipette monouso senza DNase/RNase con filtri
- Guanti monouso senza polvere

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Il kit GSD NovaType SARS-CoV-2 ID viene spedito su ghiaccio secco e tutti i componenti dovrebbero arrivare congelati.

- Tutti i componenti devono essere conservati tra -30 °C e -15 °C immediatamente dopo l'arrivo.
- Si devono evitare ripetuti cicli di scongelamento dei reagenti (più di due), poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del kit. I reagenti devono essere congelati in aliquote se utilizzati ad intermittenza.
- Mantenere la conservazione non congelata (ad es. conservazione su ghiaccio) il più breve possibile.
- Conservare la E-MIX e il PP|VAR nel congelatore, fino a quando non si è pronti per l'uso.
- Proteggere la E-MIX e il PP|VAR dalla luce.

6. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Il RNA o acido nucleico totale estratto da tipi di campioni respiratori umani (lavaggio nasale / tampone, lavaggio nasofaringeo/ tampone, tampone orofaringeo, lavaggio broncoalveolare e soluzione per gargarismi) precedentemente risultati positivi all'RNA di SARS-CoV-2 con metodi RT-PCR. p.es. GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) è il materiale di partenza per il GSD NovaType SARS-CoV-2 ID.
- La qualità dell'RNA estratto ha un effetto cruciale sulle prestazioni dell'intero sistema di test RT-PCR. Assicurarsi che il metodo di estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia Real-Time PCR.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Impostazione della Reazione

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta osservanza delle istruzioni per l'uso.
- Prima dell'uso assicurarsi che tutti i campioni e i reagenti siano scongelati completamente, miscelare mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex.
- Importante: **E-MIX** è viscoso. Far girare brevemente il tubo per assicurarsi che il materiale non si sia incastrato nel tappo o nel lato del tubo. Accertarsi di pipettare e dispensare con cura, e utilizzare puntali per pipettare liquidi viscosi.
- Si raccomanda vivamente l'uso d'acqua senza nucleasi e senza acidi nucleici come „No Template Control“ (NTC), controllo senza dima).
- Definire le posizioni (pozzetti) dei campioni e dei controlli (NTC) sulla piastra.

Impostazione della Reazione	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Campione o NTC	12 µL
Volume totale	20 µL

- Chiudere la piastra di reazione ottica con il corrispondente materiale di chiusura ottica.
- Centrifugare la piastra di reazione ottica in una centrifuga con un rotore per piastre di microtitolazione per 60 secondi a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

7.2. Strumento di PCR in Tempo Reale

Per quanto riguarda la configurazione e la programmazione dello strumento di PCR in tempo reale, si prega di utilizzare il manuale del rispettivo strumento.

Per istruzioni di programmazione dettagliate sull'uso del GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR su specifici strumenti di PCR in tempo reale, si prega di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Impostazione d'Esecuzione RT-PCR	
Volume della Reazione	20 µL
Ramp Rate	Standard o Fast
Riferimento Passive	ROX™

Rilevatori Fluorescenti / Fluoroforo

Il rilevamento del frammento di acido nucleico virale amplificato viene eseguito nei canali di rilevamento FAM™ (mutazione del gene S N501Y e A570D) e HEX™ (tipo di gene S selvatico N501Y e A570D) con Quencher MGBEQ. Le impostazioni per l'ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) sono indicate tra parentesi.

Rilevatori	Varianti del gene S	Fluoroforo	Quencher
SARS-CoV-2 Gene S	N501Y mutazione	FAM™	MGBEQ (nessuno)
	N501 tipo selvatico	HEX™ (VIC®)	
	A570D mutazione	FAM™	
	A570 tipo selvatico	HEX™ (VIC®)	

Profilo della Temperatura e Raccolta di Dati

No. di Cicli	Temperatura	Durata (min)	Raccolta di Dati
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Misura di fluorescenza alla fine di ogni ciclo

Prima di iniziare l'esecuzione del test, si prega di controllare le impostazioni per i cicli, la temperatura e il tempo.

8. RISULTATI

L'analisi dei dati deve essere eseguita con il software del dispositivo di PCR in tempo reale utilizzato secondo le istruzioni del produttore.

Impostazioni per l'analisi:

Configurazione	Raccomandazione
Soglia	Soglia inserire un valore per la soglia in modo che la soglia sia: <ul style="list-style-type: none">• Sopra lo sfondo• Sotto l'altopiano e le regioni lineari della curva di amplificazione• All'interno della fase esponenziale della curva di amplificazione
Linea di Base	Selezionare i valori di inizio e fine ciclo in modo che la linea di base finisca prima che venga rilevata una fluorescenza significativa.

8.1. Criteri di Validazione del Test

Il test è valido solo se la RT-PCR è completa.

I valori Ct de NTC devono soddisfare i criteri di accettazione nella tabella sottostante perché il test sia valido.

Solo allora i dati del campione possono essere analizzati e interpretati.

Criteri di Validazione	Risultato/Acceptabile Ct	Valida / non valida	Misura
NTC	Non rilevato (ND)	Valida	-
	Ct ≤ 40	Non valida	Ripetere il test

8.2. Interpretazione dei Risultati

Se il test è valido, l'interpretazione dei risultati del campione è la seguente:

- Positivo (POS): Ct ≤ 38
- Negativo (neg): Non rilevato (ND) o Ct > 38

SARS-CoV-2 S Gen	Canale di Rilevazione	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
tipo selvatico	POS	neg
lignaggio B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
lignaggio B.1.351 (N501Y)	POS	POS

La differenziazione delle varianti del virus rispetto ai codoni 501 e 570 del gene S è possibile solo per i campioni

- che sono già stati testati positivamente per la presenza di RNA del SARS-CoV-2 e
- il cui valore Ct in uno o entrambi i canali del gene S è inferiore a Ct ≤ 38

9. LIMITAZIONE DELLA PROCEDURA

Quantità molto basse di materiale di partenza, ad esempio campioni debolmente positivi (valori Ct elevati nella precedente diagnosi di SARS-CoV-2 PCR), possono risultare in test GSD NovaType SARS-CoV-2 ID eseguiti con segnali negativi. Tuttavia, tali risultati non escludono la presenza di RNA del SARS-CoV-2.

10. CONTROLLO QUALITÀ

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO di NovaTec Immundiagnostica GmbH, ogni lotto di GSD NovaType SARS-CoV-2 ID è stato testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

11. MARCHI E LIMITAZIONI DI RESPONSABILITÀ

I nomi registrati, i marchi registrati, ecc. Utilizzati in questo documento sono da considerarsi protetti dalla legge anche se non espressamente contrassegnati come tali.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- **SOLO DI RICERCA. Non per l'uso in procedure diagnostiche.**
- Tutti i campioni di origine umana devono essere considerati e trattati come potenzialmente infettivi.
- Non scambiare reagenti di diversi lotti di produzione.
- Nessun reagente di altri produttori deve essere usato insieme ai reagenti di questo kit per il test.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Indossare guanti monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi quando si maneggiano i campioni.
- Usare sempre provette di reazione monouso senza DNase/RNase-free e puntali per pipette con barriere aerosol.
- Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi (DNase/RNasi) del campione e dei componenti del kit.
- Per evitare la contaminazione dello spazio di lavoro con acidi nucleici, le provette/piastre di reazione non devono essere aperte dopo l'amplificazione.
- RT-PCR è altamente sensibile alla contaminazione da acidi nucleici. Pertanto, il materiale positivo / potenzialmente positivo deve essere conservato separatamente da tutti gli altri componenti del kit.
- Dedicare le forniture e le attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Questo test non deve essere usato direttamente sul campione.
- Prima di usare questo test, l'acido nucleico deve essere estratto con metodi di estrazione adeguati dal campione originale.
È essenziale seguire le informazioni contenute nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione, soprattutto per quanto riguarda i diversi materiali del campione!
- Poiché l'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale, è necessario eliminarlo completamente prima dell'eluizione dell'acido nucleico durante l'estrazione. Se si utilizzano colonne di centrifugazione con tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si raccomanda vivamente di eseguire una fase di centrifugazione supplementare di 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm) prima di eluire l'RNA. Per questa fase aggiuntiva di centrifugazione, utilizzare una nuova provetta di raccolta.
- Il risultato di questo kit RT-PCR può essere influenzato da potenziali mutazioni nel genoma dell'agente patogeno se si trovano nella regione di legame primer / sonda. Può verificarsi una sottostima e/o il mancato rilevamento dell'agente patogeno.
- Gli inibitori RT-PCR possono anche provocare sottostima, risultati falsi negativi o esecuzioni non valide. Pertanto, utilizzare solo kit di estrazione degli acidi nucleici, che rimuovono gli inibitori RT-PCR e che sono dedicati ai processi RT-PCR a valle.
- La Real-Time PCR è progettata solo per personale qualificato che ha familiarità con la buona pratica di laboratorio e che è addestrato in RT-PCR.
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 determinazioni)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

A finales de 2019 surgió una nueva enfermedad respiratoria en la ciudad de Wuhan, en la provincia de Hubei de la República Popular China, que pronto se propagó rápidamente dentro del país y en todo el mundo. El agente causal se identificó como el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV-2). El SARS-CoV-2 (2019-nCoV), al igual que el coronavirus del SARS estrechamente relacionado (SARS-CoV), pertenece al género Betacoronavirus de la familia de los coronavirus. El reservorio zoonótico del virus parece ser los murciélagos.

Los coronavirus son virus de ARN grandes, monocatenarios, de sentido positivo que infectan a los seres humanos, pero también a una amplia gama de animales. Los coronavirus humanos comunes NL63, 229E, OC43 y HKU1 se propagan comúnmente, especialmente durante los meses de invierno. Son responsables de hasta un tercio de todas las enfermedades respiratorias agudas, típicamente con síntomas leves (resfriado común). Más del 80 % de la población adulta tiene anticuerpos contra los coronavirus humanos. La inmunidad de las infecciones anteriores dura sólo un corto período. Por lo tanto, las reinfecciones con el mismo patógeno son posibles después de un año.

El SARS-CoV-2 se transmite predominantemente por infección por gotitas a través de la tos o los estornudos y por el contacto cercano con pacientes infectados. En teoría, la infección por fómites y la infección a través de la conjuntiva de los ojos también son posibles.

El período de incubación se sitúa en la media de 5-6 días (y puede alcanzar un máximo de 14 días).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad COVID-19 relacionada con el SARS-CoV-2 incluyen fiebre, tos, problemas respiratorios y fatiga. En la mayoría de los pacientes la infección se manifiesta con síntomas de una enfermedad febril leve con infiltraciones pulmonares irregulares.

El signo clínico inicial de COVID-19 que permitió la detección del caso fue la neumonía. Pero resultó que el curso de la enfermedad no es específico y varía ampliamente, desde cursos asintomáticos hasta neumonía severa con insuficiencia pulmonar y muerte. Sin embargo, según los conocimientos actuales, alrededor del 80 % de las enfermedades son leves a moderadas.

Aunque los casos graves de la enfermedad también se producen en pacientes más jóvenes y en personas sin enfermedad previa, los siguientes grupos de personas tienen un mayor riesgo de padecer formas graves de la enfermedad: personas de edad avanzada (con un riesgo cada vez mayor a partir de los 50-60 años de edad), fumadores y personas con determinadas enfermedades del sistema cardiovascular o los pulmones, pacientes con enfermedades hepáticas crónicas, diabetes mellitus, cáncer o pacientes con un sistema inmunológico debilitado (por ejemplo, debido a deficiencias inmunológicas o por tomar medicamentos que suprimen el sistema inmunológico).

El tratamiento se centra en medidas de apoyo en función de la gravedad del cuadro clínico (por ejemplo, administración de oxígeno, gestión del equilibrio de líquidos, etc.), así como en el tratamiento de las enfermedades subyacentes pertinentes. Durante el transcurso de la pandemia de SARS-CoV-2 se han investigado y se están investigando varios enfoques terapéuticos específicos (directamente antivirales eficaces, inmunomoduladores eficaces).

A finales de 2020 se identificaron dos variantes de COVID-19 que presentan mutaciones en diferentes posiciones del gen S, que codifica la proteína de la espiga. Algunas de estas mutaciones dan lugar a una mayor infectividad. En particular, se identifica la mutación N501Y como una de las causas principales. Esta mutación se encuentra en los aislados del virus en el Reino Unido (UK), linaje B.1.1.7, y en Sudáfrica, linaje B.1.351. Estas dos variantes pueden distinguirse por la mutación A570D, que además sólo está presente en la variante del Reino Unido.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
SARS-CoV-2 (coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo y grave)	COVID-19	El curso de la enfermedad es inespecífico, diverso y muy variable, desde casos asintomáticos hasta neumonía grave con insuficiencia pulmonar y muerte	Modo de transmisión primario: infección por gotitas; las infecciones por fómites y las infecciones a través de la conjuntiva de los ojos son teóricamente posibles

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Prueba de ácidos nucleicos (NAT): p.ex. RT-PCR
- Serología: detección de anticuerpos por p.ex.ELISA

2. USO PREVISTO (PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN)

El GSD NovaType SARS-CoV-2 ID es un ensayo de PCR de transcripción inversa en tiempo real de uso exclusivo en investigación (RUO) diseñado para la detección cualitativa simultánea y la discriminación de las variantes del gen S del SARS-CoV-2 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2) de tipo salvaje, y de las mutaciones N501Y y A570D. El material de la muestra debe ser ARN genómico extraído de muestras respiratorias humanas (lavado nasal / hisopo, lavado nasofaríngeo / hisopo, hisopo orofaríngeo, lavado broncoalveolar y solución de gárgaras) que hayan dado previamente positivo para ARN de SARS-CoV-2 por métodos de RT-PCR de diagnóstico, por ejemplo, GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19). El GSD NovaType SARS-CoV-2 ID no está destinado expresamente al diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 y no debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico. Sólo está diseñado para ayudar a las investigaciones relacionadas con la prevalencia y la frecuencia de las variantes del virus.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación cualitativa del ARN específico se basa en la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa en Tiempo Real (RT-PCR). El test contiene cebadores y sondas específicas marcadas con colorantes fluoróforos reposter y aceptores (quencher) para la amplificación y detección simultánea de secuencias específicas del ARN viral que representan variantes **específicas del gen S del SARS-CoV-2**.

Las sondas específicas del gen de interés están marcadas con los fluoróforos HEX™ y FAM™ permitiendo así la discriminación paralela entre el gen S de tipo salvaje y las mutaciones N501Y y A570D.

La GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR ha sido validada para las siguientes plataformas de PCR en tiempo real:

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems™)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- AriaDx™ (Agilent Technologies)

4. MATERIALES

4.1. Reactivos Suministrados

Tapa	Símbolo	Componente	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Número de botella	Volume per botella [μL]
verde	E-MIX	RT-PCR Mezcla de Enzimas (transcriptasa reversa, arranque en caliente de la polimerasa de ADN (<i>hot-start</i> polimerasa), inhibidor de la RNasa, nucleótidos, magnesio, estabilizadores y tampón)	1 (4)	550
azul/blanco	PP VAR	Primer-Probe-Mix (para la discriminación de variantes)	1 (4)	350

4.2. Materiales y Equipos necesarios y no suministrado

- Agua desionizada libre de nucleasas y de ácidos nucleicos
- Instrumento de PCR en tiempo real (para instrumentos ya validados, véase el 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO)
También podrían ser apropiados otros instrumentos de PCR en tiempo real. Su idoneidad para el uso con el GSD NovaType SARS-CoV-2 ID tiene que ser validada por el usuario.
- Consumibles apropiados para la PCR en tiempo real (por ejemplo, tubos de plástico desechables, placas de reacción, materiales de cierre óptico correspondientes)
- Microcentrífuga de mesa
- Centrifugadora con un rotor para placas de microtitulación
- Mezclador de vórtice
- Pipetas ajustables en relación con la configuración de la reacción
- Puntas de pipeta desechables sin DNasa/RNasa con filtros
- Guantes desechables sin polvo

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El kit de GSD NovaType SARS-CoV-2 ID es enviado en hielo seco y todos los componentes deben llegar congelados.

- Todos los componentes deben ser almacenados entre -30 °C y -15 °C inmediatamente después de su llegada.
- Deben evitarse los ciclos repetidos de descongelación por congelación (más de dos) de los reactivos, ya que esto podría afectar al rendimiento del kit. Los reactivos deben ser congelados en alícuotas si se usan de forma intermitente.
- Mantenga el almacenamiento sin congelar (por ejemplo, el almacenamiento en hielo) lo más corto posible.
- Mantenga el E-MIX y el PP VAR en el congelador, hasta que esté listo para usarlo.
- Proteja el E-MIX y el PP VAR de la luz.

6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El ARN extraído o el ácido nucleico total extraído de tipos de muestras respiratorias humanas (lavado nasal / hisopo, lavado nasofaríngeo / hisopo, hisopo orofaríngeo, lavado broncoalveolar y solución de gárgaras) previamente probados como positivos para el ARN del SARS-CoV-2 por métodos de RT-PCR, por ejemplo, GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) es el material de partida para el GSD NovaType SARS-CoV-2-ID.
- La calidad del ARN extraído tiene un efecto crucial en el rendimiento de todo el sistema de prueba RT-PCR. Asegúrese de que el método de extracción de ácido nucleico es compatible con la tecnología de PCR en tiempo real.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Configuración de la Reacción

- Por favor, lea atentamente las instrucciones de uso **antes** de realizar el test. La fiabilidad de los resultados depende de seguir estrictamente las instrucciones de uso.
- Antes de su uso, asegúrese que todas las muestras y reactivos se hayan descongelado completamente, mezclado por pipeteo hacia arriba y hacia abajo o vórtice y centrifugar brevemente.
- Importante: el **E-MIX** es viscoso. Gire brevemente el tubo para asegurarse de que el material no se ha alojado en la tapa o en el lateral del tubo. Asegúrese de pipetear y dispensar con cuidado, y utilice puntas de pipeta adecuadas para pipetear líquidos viscosos.
- Se recomienda encarecidamente el uso d'agua libre de nucleasas y de ácidos nucleicos como „No Template Control“ (NTC, control sin molde).
- Defina las posiciones (pocillos) para las muestras y controles (NTC) en la placa.

Configuración de la Reacción	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Muestra o NTC	12 µL
Volumen total	20 µL

- Cierre la placa de reacción óptica con el correspondiente material de cierre óptico.
- Centrifugar la placa de reacción óptica en una centrífuga con un rotor para placa de microtitulación durante 60 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

7.2. Programación del Instrumento de PCR en Tiempo Real

En cuanto a la configuración y programación del instrumento de PCR en tiempo real, por favor use el manual del respectivo instrumento.

Para instrucciones de programación detalladas sobre el uso del GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR en instrumentos específicos de PCR en tiempo real, por favor contacte con NovaTec Immundiagnostica GmbH.

RT-PCR Configuración de la ejecución	
Volumen de Reacción	20 µL
Ramp Rate	Standard ou Fast
Referencia Pasiva	ROX™

Detectores Fluorescentes / Fluoróforos

La detección del fragmento de ácido nucleico viral amplificado se realiza en los canales de detección FAM™ (mutación del gen S N501Y y A570D) y HEX™ (gen S de tipo salvaje N501Y y A570D) con MGBEQ Quencher. Los parámetros para el ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) se encuentran entre paréntesis.

Detector	Variante gen S	Fluoróforo	Quencher
SARS-CoV-2 Gene S	N501Y mutación	FAM™	MGBEQ (ninguno)
	N501 tipo salvaje	HEX™ (VIC®)	
	A570D mutación	FAM™	
	A570 tipo salvaje	HEX™ (VIC®)	

Perfil de Temperature y Recopilación de Datos

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)	Recopilación de Datos
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Medición de la fluorescencia al final de cada ciclo

Antes de iniciar el test, por favor, verifique los ajustes de los ciclos, la temperatura y el tiempo.

8. RESULTADOS

El análisis de los datos debe efectuarse con el software del dispositivo de PCR en tiempo real utilizado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Criterios de análisis:

Configuración	Recomendación
Umbral	Introduzca un valor para el umbral de modo que el umbral sea: <ul style="list-style-type: none">Sobre el fondoPor debajo de la meseta y las regiones lineales de la curva de amplificaciónDentro de la fase exponencial de la curva de amplificación
Línea de base	Seleccione los valores de inicio y final del ciclo para que la línea de base termine antes de que se detecte una fluorescencia significativa.

8.1. Criterios de Validez del Ensayo

El test sólo es válido si la RT-PCR está completa.

Los valores de Ct del NTC deben cumplir los criterios de aceptación de la tabla siguiente para que la prueba sea válida.

Sólo entonces se pueden analizar e interpretar los datos de la muestra.

Criterios de Validación	Resultado/Aceptables Ct	Válido/Inválido	Medida
NTC	No Detectado (ND)	válido	-
	Ct ≤ 40	inválido	Repetir el test

8.2. Interpretación de los Resultados

Si el test es válido, la interpretación de los resultados de la muestra es la siguiente:

- Positivo (POS): Ct ≤ 38
- Negativo (neg): No Detectado (ND) o Ct > 38

Gene S del SARS-CoV-2	Canal de Detección	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
tipo selvatico	POS	neg
lignaggio B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
lignaggio B.1.351 (N501Y)	POS	POS

La diferenciación de las variantes del virus a partir de los codones 501 y 570 del gen S se aplica únicamente a las muestras,

- que han dado positivo en las pruebas de ARN del SRAS-CoV-2 y
- cuyo valor Ct en uno o ambos canales de detección del gen S es inferior a Ct ≤ 38.

9. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Cantidades muy bajas de material de inicio, por ejemplo, muestras débilmente positivas (valores Ct altos en la PCR de diagnóstico previo del SARS-CoV-2), puede resultar en que los test de GSD NovaType SARS-CoV-2 ID se ejecuten con señales negativas. Sin embargo, estos resultados no excluyen la presencia de ARN de SARS-CoV-2.

10. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad certificado por la ISO de NovaTec Immundiagnostica GmbH, cada lote del ensayo GSD NovaType SARS-CoV-2 ID se prueba según las especificaciones dadas para asegurar una calidad de producto consistente.

11. MARCAS COMERCIALES Y CLÁUSULAS DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

Los nombres registrados, marcas comerciales, etc. utilizados en este documento deben considerarse protegidos por la ley aunque no estén marcados específicamente como tales.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- **PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.**
- Todas las muestras de origen humana deben considerarse y manipularse como potencialmente infecciosas.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No deben utilizarse reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de pruebas.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Utilice guantes desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras.
- Utilice siempre tubos de reacción y puntas de pipeta desechables sin DNasa/RNasa con barreras de aerosol.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasas (DNasa/RNasa) de la muestra y de los componentes del kit.
- Para evitar la contaminación del espacio de trabajo con ácidos nucleicos, los tubos/placas de reacción no deben abrirse después de la amplificación.
- La RT-PCR es muy sensible a la contaminación por ácidos nucleicos. Por lo tanto, el material positivo/potencialmente positivo debe almacenarse por separado de todos los demás componentes del kit.
- Dedique los suministros y el equipo a las áreas de trabajo separadas y no las mueva de un área a otra.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra.
- Antes de utilizar esta prueba, se extraerá el ácido nucleico con métodos de extracción adecuados de la muestra original. Es esencial seguir la información que figura en las instrucciones de uso del equipo de extracción, especialmente en lo que respecta a los diferentes materiales de muestra.
- Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo completamente antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. Si se utilizan columnas de centrifugación con tampones de lavado que contengan etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional de 10 minutos a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de la elución del ARN. Para este paso de centrifugación adicional, utilice un nuevo tubo de recolección.
- El resultado de este kit de RT-PCR puede estar influenciado por potenciales mutaciones en el genoma del patógeno si se localizan en la región de unión del cebador/sonda. Puede producirse una subestimación y/o un fallo en la detección del patógeno.
- Los inhibidores de la RT-PCR también pueden provocar subestimación, resultados negativos falsos o ejecuciones inválidas. Por lo tanto, sólo se deben utilizar kits de extracción de ácidos nucleicos que eliminen los inhibidores de la RT-PCR y que estén dedicados a procesos de RT-PCR posteriores.
- La PCR en tiempo real sólo está diseñada para personal cualificado que esté familiarizado con las buenas prácticas de laboratorio y capacitado en RT-PCR.
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Indicaciones para la Eliminación de Residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 determinaciones)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 determinaciones)

PORTUGUÊS

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, uma nova doença respiratória surgiu na cidade de Wuhan, província de Hubei da República Popular da China, e logo se espalhou rapidamente pelo país e pelo mundo. O agente causador foi identificado como coronavírus 2 (SARS-CoV-2), síndrome respiratória aguda grave. O SARS-CoV-2 (2019-nCoV), tal como o vírus corona da SARS (SARS-CoV), pertence ao gênero Betacoronavirus dentro da família dos coronavírus. O reservatório zoonótico do vírus parece ser um morcego.

Os coronavírus são vírus RNA positivos de cadeia única e grande que infectam humanos, mas também uma grande variedade de animais. Os coronavírus humanos comuns NL63, 229E, OC43 e HKU1 estão disseminados especialmente durante os meses de inverno. Eles são responsáveis por até um terço de todas as doenças respiratórias agudas, tipicamente com sintomas leves (resfriado comum). Mais de 80 % da população adulta tem anticorpos contra os coronavírus humanos. A imunidade a infecções anteriores dura apenas por um curto período de tempo. Portanto, reinfecções com o mesmo patógeno são possíveis logo após um ano.

A SARS-CoV-2 é predominantemente transmitida por infecção por gotículas através da tosse ou espirros e através do contacto próximo com doentes infectados. Em teoria, a infecção por esfregaço e infecção através da conjuntiva dos olhos também é possível.

O período de incubação é na mediana de 5-6 dias (e até 14 dias no máximo).

As manifestações clínicas da doença COVID-19 relacionada à SARS-CoV-2 incluem febre, tosse, problemas respiratórios e fadiga. Na maioria dos pacientes a infecção manifesta-se com sintomas de uma doença febril leve com infiltrações pulmonares irregulares.

O sinal clínico inicial da doença COVID-19 que permitiu a detecção de casos foi pneumonia. Mas verificou-se que o curso da doença não é específico e varia muito, desde cursos assintomáticos até pneumonia grave com insuficiência pulmonar e morte. Entretanto, com base no conhecimento atual, cerca de 80 % das doenças são de leve a moderada.

Embora cursos graves da doença também ocorram em pacientes mais jovens e pessoas sem doença prévia, os seguintes grupos de pessoas têm um risco aumentado de formas graves da doença: idosos (com um risco cada vez maior a partir dos 50-60 anos de idade), fumantes e pessoas com certas doenças do sistema cardiovascular ou dos pulmões, pacientes com doenças hepáticas crônicas, diabetes mellitus, câncer, ou pacientes com sistema imunológico enfraquecido (por exemplo, devido a deficiências imunológicas ou tomando medicamentos que suprimem o sistema imunológico).

O tratamento se concentra em medidas de apoio dependendo da gravidade do quadro clínico (por exemplo, administração de oxigênio, gerenciamento do equilíbrio de fluidos, etc.), bem como o tratamento de doenças subjacentes relevantes. Várias abordagens terapêuticas específicas (diretamente antiviral eficaz, imunomodulador eficaz) foram e estão sendo investigadas em estudos durante o curso da pandemia do SARS-CoV-2.

No final de 2020 foram identificadas duas variantes da COVID-19 que mostram mutações em diferentes posições do gene S, codificando para a proteína spike. Algumas dessas mutações resultam em maior infecciosidade. Em particular, a mutação N501Y é identificada como uma causa raiz. Esta mutação é encontrada em isolados de vírus no Reino Unido (UK), linhagem B.1.1.7, e na África do Sul, linhagem B.1.351. Estas duas variantes podem ser distinguidas pela mutação A570D, que está adicionalmente presente apenas na variante do Reino Unido.

Espécies	Doença	Sintomas (p.ex.)	Via de transmissão
SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2)	COVID-19	O curso da doença não é específico, diverso e varia muito, desde cursos assintomáticos até pneumonia grave com falha pulmonar e morte	modo primário de transmissão: infecção por gotículas; Infecções por esfregaço e infecções através da conjuntiva dos olhos são teoricamente possíveis

A presença de agentes patogênicos ou de infecção pode ser identificada através

- Técnicas de Amplificação de Ácido Nucleico (NAT): por exemplo, PCR-RT
- Serologia: detecção de anticorpos por exemplo, ELISA

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA (ESCLUSIVAMENTE PARA A INVESTIGAÇÃO)

O GSD NovaType SARS-CoV-2 ID é um teste de transcrição reversa em tempo real (PCR-RT) de uso exclusivo para investigação (RUO) projetado para a detecção qualitativa e discriminação simultânea do gene S do corona vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda severa 2) as variantes tipo selvagem, e mutações N501Y e A570D. O material de amostra deve ser o RNA genômico extraído do respiratório humano (lavagem nasal, lavagem nasofaríngea, esfregaço orofaríngeo, lavado broncoalveolar e solução gargarejante) tipos de espécimes que tenham sido previamente testados positivos para o RNA do SARS-CoV-2 pelos métodos diagnósticos PCR-RT, por exemplo, GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19). O GSD NovaType SARS-CoV-2 ID não se destina expressamente ao diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 e não à utilização em procedimentos de diagnóstico. Foi projetado apenas para auxiliar investigações relacionadas à prevalência e frequência de variantes do vírus.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

A determinação qualitativa do RNA específico é baseada na tecnologia PCR-RT (Real-Time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction). O kit contém primers e sondas específicas rotuladas com repórter fluorescente e corante de Quencher para amplificação e detecção simultânea de seqüências específicas de RNA que representam variantes **específicas do gene S do SARS-CoV-2**.

As sondas específicas do gene de interesse são rotuladas com os fluoróforos HEXTM e FAMTM, permitindo assim a discriminação paralela entre o tipo selvagem do gene S e as mutações N501Y e A570D. O GSD NovaType SARS-CoV-2 ID PCR-RT foi validado para seguir plataformas de PCR em tempo real:

- ABI Prism® 7500 SDS (Applied BiosystemsTM)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied BiosystemsTM)
- AriaMxTM (Agilent Technologies)
- AriaDxTM (Agilent Technologies)

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes Fornecidos

Tampa	Símbolo	Componente	PCOV6050T (PCOV6054T)	
			Número de frascos	Volume por frasco [µL]
verde	E-MIX	Mistura Enzimática RT-PCR (transcriptase reversa, polimerase de DNA de arranque a quente, inibidor de RNase, nucleotídeos, magnésio, estabilizadores e tampão)	1 (4)	550
azul/branco	PP VAR	Primer-Probe-Mix (para discriminação de variantes)	1 (4)	350

4.2. Materiais e Equipamento necessários, mas não fornecidos

- Água desionizada sem núcleo e sem ácidos nucleicos
- Instrumento de PCR em tempo real (para instrumentos já validados, consulte 3. PRINCÍPIO DO TESTE)
Instrumentos alternativos de PCR em tempo real também podem ser apropriados. Sua adequação para uso com o GSD NovaType SARS-CoV-2 ID tem que ser validada pelo usuário.
- Consumíveis adequados para PCR em tempo real (por exemplo: tubos descartáveis, placas de reação, materiais de fechamento ótico correspondentes)
- Microcentrífuga de mesa
- Centrífuga com rotor para Placa de Microtitulação
- Misturador Vortex
- Pipetas ajustáveis em relação à configuração de reação
- Pontas de pipeta descartáveis sem DNase/RNase com filtros
- Luvas descartáveis sem pó

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

O kit GSD NovaType SARS-CoV-2 ID é enviado em gelo seco e todos os componentes do KIT devem chegar congelados.

- Todos os componentes têm que ser armazenados entre -30 °C e -15 °C imediatamente após a chegada.
- Os ciclos repetidos de descongelamento (mais de dois) de reagentes devem ser evitados, uma vez que isto pode afetar o desempenho do kit. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se forem utilizados de forma intermitente.
- Manter o armazenamento não congelado (por exemplo, armazenamento em gelo) o mais curto possível.
- Mantenha o **E-MIX** e o **PP | VAR** no freezer, até que esteja pronto para usá-lo.
- Proteger o **E-MIX** e o **PP | VAR** da luz.

6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- O RNA extraído ou ácido nucleico total extraído de amostras respiratórias humanas (lavagem nasal, lavagem nasofaríngea, esfregaço orofaríngeo, lavagem broncoalveolar e solução gargarejante) previamente testado positivo para RNA SARS-CoV-2 pelos métodos RT-PCR, por exemplo, GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) é o material de partida para o GSD NovaType SARS-CoV-2 ID.
- A qualidade do RNA extraído tem um efeito crucial sobre o desempenho de todo o sistema de teste RT-PCR. Certifique-se de que o método de extração do ácido nucleico seja compatível com a tecnologia de PCR em Tempo Real.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

7.1. Configuração da Reação

- Leia atentamente as instruções de uso antes de realizar o ensaio. A confiabilidade dos resultados depende de seguir estritamente as instruções de uso.
- Antes de usar, certifique-se de que todas as amostras e reagentes estejam completamente descongeladas, misturadas por pipetagem para cima e para baixo ou por vórtice e centrifugadas brevemente.
- Importante: **E-MIX** é viscosa. Gire brevemente o tubo para garantir que o material não tenha se alojado na tampa ou na lateral do tubo. Certifique-se de pipetar e distribuir cuidadosamente, e use pontas de pipetas adequadas para pipetar líquidos viscosos.
- É altamente recomendado o uso água sem núcleo e sem ácidos nucleicos como „No Template Control“ (NTC, controle sem modelo).
- Definir as posições (poços) para amostras e controles (NTC) na placa.

Configuração da Reação	
E-MIX	5 µL
PP VAR	3 µL
Amostra ou NTC	12 µL
Volume total	20 µL

- Fechar a placa de reação óptica com o correspondente material de fechamento óptico.
- Centrifugar a placa de reação óptica em uma centrífuga com rotor para placas de microtitulação por 60 segundos a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

7.2. Instrumento de PCR em Tempo Real

Em relação à configuração e programação do instrumento de PCR em Tempo Real, por favor, use o manual do respectivo instrumento.

Para instruções de programação detalhadas sobre o uso do GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR em instrumentos específicos de PCR em Tempo Real, favor contatar a NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Configurações de Execução PCR-RT	
Volume de Reação	20 µL
Ramp Rate	Standard ou Fast
Referência Passiva	ROX™

Detetores Fluorescentes / Fluoróforos

A detecção do fragmento de ácido nucleico viral amplificado é realizada nos canais de detecção FAM™ (mutação do gene S N501Y e A570D) e HEX™ (gene S tipo selvagem N501Y e A570D) com Quencher MGBEQ. As configurações para o ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) estão indicadas entre parênteses.

Detetores	Variantes do Gene S	Fluoróforos	Quencher
SARS-CoV-2 Gene S	N501Y mutação	FAM™	MGBEQ (nenhum)
	N501 tipo selvagem	HEX™ (VIC®)	
	A570D mutação	FAM™	
	A570 tipo selvagem	HEX™ (VIC®)	

Perfil de Temperatura e Coleta de Dados

No. de Ciclos	Temperatura	Tempo (min)	Coleta de Dados
1	50 °C	10:00	-
1	95 °C	03:00	-
40	95 °C	00:10	-
	60 °C	00:30	Medição de fluorescência no final de cada ciclo

Antes de iniciar a execução do teste, verifique as configurações para ciclos, temperatura e tempo.

8. RESULTADOS

A análise dos dados deve ser realizada com o software do dispositivo de PCR-RT em tempo real utilizado, de acordo com as instruções do fabricante.

Configurações de análise:

Configuração	Recomendação
Limiar	Introduzir um valor para o limiar de modo que o limiar seja: <ul style="list-style-type: none">• Acima do fundo• Abaixo do platô e das regiões lineares da curva de amplificação• Dentro da fase exponencial da curva de amplificação
Linha de base	Selecionar valores de início e fim de ciclo para que a linha de base termine antes que seja detectada uma fluorescência significativa.

8.1. Critérios de Validação do Teste

O teste só é válido se o RT-PCR estiver completo.

Os valores Ct da NTC devem atender ao critério de aceitação da tabela abaixo para que o ensaio seja válido.

Somente depois disso os dados da amostra podem ser analisados e interpretados.

Critérios de Validação	Resultado/Aceitável Ct	Válido/Inválido	Medida
NTC	Não Detectado (ND)	válido	-
	Ct ≤ 40	inválido	Repetir o teste

8.2. Interpretação dos Resultados

Se o teste for válido, os resultados da amostra são interpretados da seguinte forma:

- Positivo (POS): Ct ≤ 38
- Negativo (neg): Não detectado (ND) ou Ct > 38

SARS-CoV-2 S Gen	Canal de Detecção	
	HEX™ (VIC®)	FAM™
tipo selvagem	POS	neg
linhagem B.1.1.7 (N501Y/A570D)	neg	POS
linhagem B.1.351 (N501Y)	POS	POS

A diferenciação das variantes de vírus com relação aos códons 501 e 570 do gene S se aplica apenas às amostras,

- que já testaram positivo para a presença de RNA SARS-CoV-2 e
- cujo valor Ct em um ou ambos os canais de detecção de genes S está abaixo do Ct ≤ 38.

9. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Quantidades muito baixas de material de partida, por exemplo, amostras fracas positivas (altos valores Ct no diagnóstico anterior PCR SARS-CoV-2), podem resultar em testes GSD NovaType SARS-CoV-2 ID executados com sinais negativos. Entretanto, tais resultados não excluem a presença do RNA SARS-CoV-2.

10. CONTROLE DE QUALIDADE

De acordo com o NovaTec Immundiagnostica GmbH Sistema de Gerenciamento de Qualidade certificado pela ISO, cada lote de GSD NovaType SARS-CoV-2 ID foi testado contra especificações pré-determinadas para garantir a qualidade consistente do produto.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento devem ser considerados protegidos por lei, mesmo que não tenham sido especificamente marcados como tal.

12. MARCAS COMERCIAIS E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADE

- **ESCLUSIVAMENTE PARA A INVESTIGAÇÃO. Não para uso em procedimentos de diagnóstico.**
- Todas as amostras de origem humana devem ser consideradas e tratadas como potencialmente infecciosas.
- Não trocar reagentes de diferentes lotes de produção.
- Nenhum reagente de outros fabricantes deve ser usado junto com os reagentes deste kit de teste.
- Não use reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar luvas descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção para os olhos ao manusear as amostras.
- Usar sempre tubos descartáveis de reação sem DNase/RNase e pontas de pipeta com barreiras de aerossol.
- Evitar a contaminação microbiana e nuclease (DNase/RNase) da amostra e dos componentes do kit.
- A fim de evitar a contaminação do espaço de trabalho com ácidos nucleicos, os tubos/placas de reação não devem ser abertos após a amplificação.
- RT-PCR é altamente sensível à contaminação com ácidos nucleicos. Portanto, o material positivo / potencialmente positivo deve ser armazenado separadamente de todos os outros componentes do kit.
- Dedique suprimentos e equipamentos às áreas de trabalho separadas e não os mova de uma área para outra.
- Este ensaio não deve ser usado diretamente sobre a amostra.
- Antes de usar este ensaio, o ácido nucleico deve ser extraído com métodos de extração adequados a partir da amostra original. É essencial seguir as informações nas instruções de uso do kit de extração, especialmente no que diz respeito aos diferentes materiais da amostra.
- Como o etanol é um forte inibidor de PCR em Tempo Real, é necessário eliminá-lo completamente antes da eluição do ácido nucleico durante a extração. Se utilizar colunas de centrifugação com tampão de lavagem contendo etanol, é altamente recomendado realizar uma etapa adicional de centrifugação de 10 min a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de eluir o RNA. Para esta etapa adicional de centrifugação, use um novo tubo de coleta.
- O resultado deste kit RT-PCR pode ser influenciado por mutações potenciais no genoma do patógeno, se elas estiverem localizadas na região de ligação do primer / sonda. Pode ocorrer subestimação e/ou falha na detecção do patógeno.
- Os inibidores de RT-PCR também podem provocar subestimação, resultados falsos negativos ou execuções inválidas. Portanto, use somente kits de extração de ácidos nucleicos, que removem os inibidores de RT-PCR e que são dedicados aos processos de RT-PCR a jusante.
- A PCR em Tempo Real é projetada apenas para pessoal qualificado que esteja familiarizado com as boas práticas de laboratório e treinado em RT-PCR.
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

12.1. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

Número do produto:	PCOV6050T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(1 x 96 Determinações)
	PCOV6054T	GSD NovaType SARS-CoV-2 ID	(4 x 96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA







European Centre for Disease Prevention and Control. Risk related to spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA, first update – 21 January 2021. ECDC: Stockholm; 2021.

Volz, Erik; Mishra, Swapnil; Chand, Meera; Barrett, Jeffrey C.; Johnson, Robert; Geidelberg, Lily et al. (2021): Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. In *medRxiv*, 2020.12.30.20249034. DOI: 10.1101/2020.12.30.20249034.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

NAT	Nucleic acid Amplification Techniques
NTC	No Template Control

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Protect from Light / Vor Licht schützen / Protéger de la Lumière / Proteggere dalla Luce / Proteger de la Luz / Proteger da Luz
RUO	FOR RESEARCH USE ONLY. Not for use in diagnostic procedures. / NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren. / UNIQUEMENT POUR LA RECHERCHE. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic. / SOLO DI RICERCA. Non per l'uso in procedure diagnostiche. / PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN. No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico. / ESCLUSIVAMENTE PARA A INVESTIGAÇÃO. Não para uso em procedimentos de diagnóstico.
REF	Product Number / Produktnummer / Numéro de produit / Numero del prodotto / Número del producto / Número do produto
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
E-MIX	RT-PCR Enzyme Mix / RT-PCR Enzym-Mix / RT-PCR Mix d'Enzymes / RT-PCR Mix di Enzima / Mescla de Enzimas RT-PCR / Mistura Enzimática RT-PCR
PP VAR	Primer-Probe-Mix
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes



NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

PCOV605xT_RUO_20210205_6 languages_Ka