

GSD NovaType SARS-CoV-2 ID RT-PCR

RUO

For Research Use Only

English	2
Deutsch.....	6
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	11
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	11
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos.....	12

Product Number: PCOV6050T (1 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

The presence of pathogen or infection 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, but 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:

- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- AriaDx™ (Agilent Technologies)

4. MATERIALS

4.1. Reagents Provided

Cap	Symbol	Component	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)	1x	550
blue/white	PP VAR	Primer-Probe-Mix (for discrimination of variants)	1x	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
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.

Detection	S Gene Variant	Dye	Quencher
SARS-CoV-2 S gene	N501Y mutation	FAM™	MGBEQ
	N501 wildtype	HEX™	MGBEQ
	A570D mutation	FAM™	MGBEQ
	A570 wildtype	HEX™	MGBEQ

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™	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!**
- 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)

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 vorgesehen, sondern 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 HEX™ und FAM™ 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:

- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- AriaDx™ (Agilent Technologies)

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	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)	1x	550
blau/weiß	PP VAR	Primer-Probe-Mix (zur Unterscheidung von Varianten)	1x	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	7,5 µL
PP VAR	10,5 µL
Probe oder NTC	12 µL
Gesamtvolumen	30 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	30 µL
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.

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

Temperaturprofil und Datenerfassung

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	25 °C	2 min	-
1	50 °C	30 min	-
1	95 °C	2 min	-
40	95 °C	15 sec	-
	60 °C	1 min	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™	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!**
- 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)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFIA / 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 / nur für Forschungszwecke / uniquement pour la recherche / solo di ricerca / para uso exclusivo en investigación / exclusivamente para a investigação
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

Fax: +49 (0) 6074-487629

Email: info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

PCOV6050T_IFU_20210129_EH