

GSD NovaType II SARS-CoV-2

RT-PCR

RUO

FOR RESEARCH USE ONLY
Not for use in diagnostic procedures

English	2
Deutsch	8
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	15
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	15
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	16

Product Number:	PCOV6083T	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6084T	(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.

The SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein (S) is exposed on the surface of virions and mediates viral entry into host cells. The S protein constitutes the primary target of all current leading vaccine candidates. This large, exposed protein is readily targeted by neutralizing antibodies, which indirectly creates selective pressure for the emergence of evasion mutations. The propensity for S to mutate may limit its future use in serological assays and vaccines, as antibodies directed against the current variant may not bind emerging mutated epitopes.

While many countries are currently experiencing a decline in overall infections, most probably due to the impact of tightened non-pharmaceutical interventions, the introduction and increased spread of new SARS-CoV-2 variants first identified in the United Kingdom (B.1.1.7), South Africa (B.1.351), and Brazil (P.1) has raised concerns.

B.1.1.7, also known as VOC 202012/01 (Nextstrain clade 20B, GISAID clade GR and PANGO lineage B.1.1.7), is defined by multiple spike protein changes (deletion 69-70, deletion 144, amino acid change N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) as well as by mutations in other genomic regions. In addition, genomically confirmed B.1.1.7 cases with an additional mutation (E484K) have been reported. This mutation is also carried by the B.1.351 and P.1 variants.

Among others, epidemiological and contact tracing data suggest an increased reproductive number as well as easier transmissibility for the B.1.1.7 variant. This may be due to higher receptor affinity through the N501Y polymorphism. According to current knowledge, the spike protein is the most important target for the action of neutralizing antibodies. Polymorphisms in this protein could therefore affect the effectiveness of the response to vaccination. However, preliminary *in vitro* studies indicate that the licensed mRNA vaccines are also effective against lineage B.1.1.7 viruses.

The B.1.351 (20H/501Y.V2) variant, first identified in South Africa (Nextstrain clade 20C, GISAID clade GH, and PANGO lineage B.1.351) is defined by multiple spike protein changes present in all viruses in the cluster (D80A, D215G, E484K, N501Y and A701V), and more recently collected viruses have additional changes. Three of the changes (K417N, E484K, and N501Y) are located within the receptor-binding domain (RBD).

Increased transmissibility is also discussed for the B.1.351 variant; evidence suggests an increase in ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) receptor affinity when the E484K and N501Y polymorphisms are combined. The K417N and E484K polymorphisms decrease sensitivity to neutralizing antibodies, which may indicate reduced efficacy of the immune response after infection and vaccination, respectively.

Variant P.1 (20J/501Y.V3, Nextstrain clade 20B, GISAID clade GR and PANGO lineage P.1), first reported by Japan in returning travelers from Brazil, and then later in Brazil has 11 amino acid changes in the spike protein compared to its ancestral lineage B.1.1.28, three of which are located in the receptor-binding domain. The full set of spike protein changes for the variant are L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I, and V1176F. The P.1 variant resembles the variant described from South Africa in certain RBD key positions (K417, E484, N501). Therefore, increased transmissibility and reduced efficacy of neutralizing antibodies are also discussed for this variant.

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 II SARS-CoV-2 is a research use only (RUO) real-time reverse transcription PCR (RT-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 K417N, E484K and N501Y. Sample material should be genomic RNA extracted from human upper respiratory (nasal wash/smear, nasopharyngeal wash/smear, oropharyngeal swab) 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 II SARS-CoV-2 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™, FAM™ and ATTO647N (alternative to CY5™) thereby allowing parallel discrimination between S gene wildtype and mutations N501Y, E484K and K417N. The internal process control Ribonuclease P (RNase P) is labelled with the fluorophore ATTO425. The human RNase P gene primer and probe set serves as an internal positive control to monitor sample quality, RNA extraction, and for detection of inhibitors of the PCR reaction.

The GSD NovaType II SARS-CoV-2 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	PCOV6083T (PCOV6084T)	
			Volume per Vial [µL]	Number of Vials
green	E-MIX	RT-PCR Enzyme Mix (reverse transcriptase, hot-start DNA polymerase, RNase inhibitor, nucleotides, magnesium, stabilizers and buffer)	550	1 (4)
blue	PP VAR	Primer-Probe-Mix (for discrimination of variants)	215	1 (4)
yellow	PP IPC	Primer-Probe-Mix (for detection of RNaseP)	110	1 (4)
red	PC	Positive Control (plasmid DNA representing SARS-CoV-2 S gene variants)	150	1 (4)
transparent	NFW	Nuclease Free Water	500	1 (4)

4.2. Materials and Equipment needed, but not provided

- Deionized nuclease-free and nucleic-acid free water
- Real-Time PCR instrument, equipped with suitable set of optical cartridges (for already validated instruments refer to 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY; for dyes used refer to 7.2.)
Alternative Real-Time PCR instruments might also be appropriate. Their suitability for use with the GSD NovaType II SARS-CoV-2 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 II SARS-CoV-2 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**, the **PP VAR** and the **PP IPC** in the freezer, until you are ready to use it.
- Protect the **E-MIX**, the **PP VAR** and the **PP IPC** 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) 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 II SARS-CoV-2.
- 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 **NFW** as no template control (NTC) is highly recommended.
- Define the positions (wells) for samples and controls (**PC** or **NFW**) on the plate.
- Depending on the RT-PCR instrument used and the available detection channels, RNase P can be used as an internal process control.

Important: If the Real-Time PCR instrument is not equipped with an ATTO425 channel, RNase P amplification must not be performed, i.e. the reaction setup must be pipetted **without** the **PP IPC** Primer-Probe-Mix, otherwise unspecific signals may occur in the other detection channels.

Reaction Setup		
Component	Including amplification of RNase P (ATTO425 channel required)	without amplification of RNase P
E-MIX	5 µL	5 µL
PP VAR	2 µL	2 µL
PP IPC	1 µL	-
NFW	-	1 µL
Sample or PC or NFW	12 µL	12 µL
Total Volume	20 µL	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 II SARS-CoV-2 RT-PCR on specific Real-Time PCR instruments please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

RT-PCR Run Settings	
Reaction Volume	20 µL
Passive Reference	None

Fluorescent Detectors / Fluorophores

Detection of the amplified viral nucleic acid fragment is performed in the detection channels FAM™ (S gene mutation N501Y), HEX™ (S gene N501 wildtype and mutation K417N) and CY5™ (S gene mutation E484K; fluorophore: ATTO647) with MGBEQ Quencher.

Detection of the amplified internal process control RNase P is performed in the detection channel ATTO425 with BHQ1 Quencher.

Detection	Wildtype	B.1.1.7 (501Y.V1)	B.1.351 (501Y.V2)	P.1 (501Y.V.3)
K417N mutation	-	-	HEX™	-
E484K mutation	-	-	CY5™	CY5™
N501Y mutation	HEX™ (wildtype)	FAM™	FAM™	FAM™
RNaseP*	ATTO425	ATTO425	ATTO425	ATTO425

* Detection of RNase P only possible if the cycler used is equipped with the appropriate detection channel (ATTO425) and the **PP|IPC** Primer-Probe-Mix is added to the reaction setup.

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. Interpretation of Results

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

The GSD NovaType II SARS-CoV-2 test protocol dictates that the controls be analyzed before sample results.

8.1.1. Controls

If kit control(s) fail, the test is invalid and needs to be repeated.

Sample data is analyzed and interpreted only after all the kit controls pass.

- NTC (no template control): must NOT have a detectable Ct in the S gene or RNase P reactions. If this control has a detectable Ct in any of the reaction wells, this indicates contamination of the PCR run and it is considered invalid and must be repeated.
- PC**: Ct ≤ 38 for all S gene targets (HEX™, FAM™ and Cy5™)
- Internal process control (RNase P): all human samples should exhibit Ct values Ct ≤ 38, thus indicating the presence of the human RNase P gene.

Failure to detect RNase P in any specimens may indicate:

- Improper extraction of nucleic acid from clinical materials resulting in loss of RNA and/or RNA degradation.
- (RT-) PCR inhibition.
- Absence of sufficient human cellular material due to poor collection or loss of specimen integrity.
- Improper assay set up and execution.
- Reagent or equipment malfunction.

If the RNase P assay does not produce a positive result for specimens, interpret as follows:

- If S gene markers are positive even in the absence of a positive RNase P, the result should be considered valid. It is possible that some samples may fail to exhibit RNase P growth curves due to low cell numbers in the original sample. A negative RNase P signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA in a specimen.
- If all S gene markers AND RNase P are negative for the specimen, the result should be considered invalid for the specimen. If residual specimen is available, repeat the extraction procedure and repeat the test. If all markers remain negative after re-test, report the results as invalid and a new specimen should be collected if possible.

8.1.2. Samples

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		Detection Channel			
S gene	Variant	HEX™	FAM™	CY5™	ATTO425* (internal process control)
N501	wildtype	POS	neg	neg	POS
N501Y	B.1.1.7 (501Y.V1)	neg	POS	neg	POS
K417N, E484K, N501Y	B.1.351 (501Y.V2)	POS	POS	POS	POS
E484K, N501Y	P.1 (501Y.V.3)	neg	POS	POS	POS

* The RNase P gene is used as an internal process control because many copies of it exist in the human genome, and it is readily detectable. RNase P is derived from the human cells that are present in every sample used. It is assumed that if human nucleic acids were extracted to detect the human gene RNase P, viral nucleic acids were also successfully extracted. The RNase P target is also amplified as a quality control for the extraction method and to corroborate the absence of PCR-inhibitors in the sample.

Discrimination of virus variants with respect to S gene codons 417, 484 and 501 is only possible for samples

- that have already been pretested positive for the presence of SARS-CoV-2 RNA and
- whose Ct value(s) in the corresponding S gene channel(s) is equal or below 38 (Ct ≤ 38)

Note on variant B.1.1.7:

1. Other spike protein changes, e.g. deletion 69-70 do not affect the present RT-PCR, as these changes are located far from the detected amplicons.
2. With the present setup, B.1.1.7 variants carrying an additional E484K mutation cannot be distinguished from the P.1 variant, as both show signals in the FAM™ and Cy5™ channels.

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 RT-PCR), can result in GSD NovaType II SARS-CoV-2 test runs with negative signals. However, such results do not exclude the presence of SARS-CoV-2 RNA.

10. 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.

11. 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.

11.1. 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.

12. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	PCOV6083T	GSD NovaType II SARS-CoV-2	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6084T	GSD NovaType II SARS-CoV-2	(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.

Das trimere Spike-Glykoprotein (S) ist auf der Oberfläche der Virionen exponiert und vermittelt den Eintritt des Virus in die Wirtszellen. Alle derzeit führenden Impfstoffkandidaten konzentrieren sich auf das Spike-Protein als Zielantigen. Dieses große, exponierte Protein kann gut von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, was indirekt einen Selektionsdruck für das Auftreten von Ausweichmutationen erzeugt. Die Tendenz S-Proteins zu mutieren, könnte seine künftige Verwendung in serologischen Tests und Impfstoffen einschränken, da Antikörper, die gegen die aktuelle Variante gerichtet sind, neu entstehende mutierte Epitope möglicherweise nicht binden.

Während in vielen Ländern derzeit ein Rückgang der Gesamtingektionen zu verzeichnen ist, der höchstwahrscheinlich auf die Auswirkungen verschärfter nicht-medikamentöser Maßnahmen zurückzuführen ist, hat die Entstehung und vermehrte Ausbreitung neuer SARS-CoV-2-Varianten, die erstmals in Großbritannien (B.1.1.7), Südafrika (B.1.351) und Brasilien (P.1) identifiziert wurden, Besorgnis ausgelöst.

B.1.1.7, auch bekannt als VOC 202012/01 (Nextstrain Klade 20B, GISAID Klade GR und PANGO Linie B.1.1.7), ist durch mehrere Veränderungen im Spike-Protein (Deletion 69-70, Deletion 144, Aminosäureaustausch N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) sowie durch Mutationen in anderen genomischen Regionen definiert. Darüber hinaus wurden genomisch bestätigte B.1.1.7-Fälle mit einer zusätzlichen Mutation (E484K) berichtet. Die Varianten B.1.351 und P.1 tragen diese Mutation ebenfalls.

Unter anderem epidemiologische und Kontaktnachverfolgungsdaten deuten auf eine erhöhte Reproduktionszahl sowie eine leichtere Übertragbarkeit der B.1.1.7-Variante hin. Dies könnte auf eine höhere Rezeptoraffinität durch den N501Y-Polymorphismus zurückzuführen sein. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist das Spike-Protein das wichtigste Ziel für die Aktivität neutralisierender Antikörper. Polymorphismen in diesem Protein könnten daher die Effektivität der Impfantwort beeinflussen. Vorläufige In-vitro-Studien deuten jedoch darauf hin, dass die zugelassenen mRNA-Impfstoffe auch gegen Viren der Linie B.1.1.7 wirksam sind.

Variante B.1.351 (20H/501Y.V2), die zuerst in Südafrika identifiziert wurde (Nextstrain-Klade 20C, GISAID-Klade GH und PANGO-Linie B.1.351), ist durch mehrere Spike-Protein-Veränderungen definiert, die in allen Viren des Clusters vorhanden sind (D80A, D215G, E484K, N501Y und A701V), und kürzlich erfasste Viren weisen zusätzliche Veränderungen auf. Drei dieser Veränderungen (K417N, E484K und N501Y) befinden sich innerhalb der Rezeptorbindungsdomäne (RBD).

Eine erhöhte Übertragbarkeit wird auch für die B.1.351-Variante diskutiert; es gibt Hinweise auf eine erhöhte ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2)-Rezeptoraffinität, wenn die Polymorphismen E484K und N501Y kombiniert vorliegen. Die Polymorphismen K417N und E484K verringern die Empfindlichkeit gegenüber neutralisierenden Antikörpern, was auf eine verminderte Wirksamkeit der Immunantwort nach einer Infektion bzw. Impfung hinweisen könnte.

Variante P.1 (20J/501Y.V3, Nextstrain-Klade 20B, GISAID-Klade GR und PANGO-Linie P.1), die zuerst in Japan bei Reiserückkehrern aus Brasilien und dann später in Brasilien gemeldet wurde, weist im Vergleich zur Vorläuferlinie B.1.1.28 11 Aminosäureaustausche im Spike-Protein auf, von denen sich drei in der Rezeptor-Bindungsdomäne befinden. Der vollständige Satz der Spike-Protein-Veränderungen für die Variante umfasst L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y,

H655Y, T1027I und V1176F. Die Variante P.1 ähnelt der aus Südafrika beschriebenen Variante in bestimmten RBD-Schlüsselpositionen (K417, E484, N501). Daher werden auch für diese Variante eine erhöhte Übertragbarkeit und eine verminderte Wirksamkeit neutralisierender Antikörper diskutiert.

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!)

Die GSD NovaType II SARS-CoV-2 ist ein Real-Time Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktions-Assay (RT-PCR) nur für Forschungszwecke (Research Use Only, RUO). Er wurde für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis und die Unterscheidung der SARS-CoV-2 („Schweres Akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) S-Gen-Varianten Wildtyp und die Mutationen K417N, E484K und N501Y entwickelt. Als Probenmaterial sollte genomische RNA verwendet werden, die aus humanen respiratorischen Proben (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngealspülung/-abstrich, Oropharyngealabstrich) extrahiert wurde und die zuvor mittels diagnostischer RT-PCR-Methoden, z.B. der GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) positiv auf SARS-CoV-2 RNA getestet wurde. Die GSD NovaType II SARS-CoV-2 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 jeweilige Gen spezifischen Sonden sind mit den Fluorophoren HEX™, FAM™ und ATTO647N (Alternative zu CY5™) markiert und ermöglichen so die parallele Unterscheidung zwischen dem Wildtyp S Gen und den Mutationen N501Y, E484K und K417N. Die interne Prozesskontrolle Ribonuclease P (RNase P) ist mit dem Fluorophor ATTO425 markiert. Das Primer- und Sonden-Set für das humane RNase P-Gen dient als interne Positivkontrolle zur Überwachung der Probenqualität, der RNA-Extraktion und zum Nachweis von Inhibitoren der PCR-Reaktion.

Die GSD NovaType II SARS-CoV-2 RT-PCR wurde für folgende Real-Time PCR Plattformen validiert:

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

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	PCOV6083T (PCOV6084T)	
			Volumen pro Röhrchen [µL]	Anzahl Röhrchen
grün	E-MIX	RT-PCR Enzym-Mix (Reverse Transkriptase, Hot-Start DNA Polymerase, Rnase-Inhibitor, Nukleotide, Magnesium and Stabilisatoren in Puffer)	550	1 (4)
blau	PP VAR	Primer-Probe-Mix (zur Unterscheidung von Varianten)	215	1 (4)
gelb	PP IPC	Primer-Probe-Mix (zum Nachweis von RNaseP)	110	1 (4)
rot	PC	Positive Control (Plasmid-DNA, die SARS-CoV-2 S Gen-Varianten repräsentiert)	150	1 (4)
transparent	NFW	Nukleasefreies Wasser	500	1 (4)

4.2. Erforderliche Materialien und Geräte, nicht mitgeliefert

- Entionisiertes Nuklease- und Nukleinsäure-freies Wasser
- Real-Time PCR Gerät, ausgestattet mit geeigneter Kombination an Filtern (für bereits validierte Geräte siehe 3. TESTPRINZIP; für verwendete Fluorophore siehe 7.2.)
Alternative Real-Time PCR Geräte sind möglicherweise ebenfalls geeignet; ihre Eignung für die Verwendung mit der GSD NovaType II SARS-CoV-2 muss vom Anwender validiert werden.
- Geeignete Real-Time PCR-Verbrauchsmaterialien (z.B. Plastikröhrchen 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 II SARS-CoV-2 Kit wird auf Trockeneis versandt und alle Komponenten sollten in gefrorenem Zustand ankommen.

- Alle Komponenten müssen unmittelbar nach Ankunft zwischen -30 °C und -15 °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**, **PP VAR** und **PP IPC** bis zur Verwendung tiefgekühlt aufbewahren.
- **E-MIX**, **PP VAR** und **PP IPC** vor Licht schützen.

6. VORBEREITUNG DER PROBEN

- Extrahierte RNA oder Gesamtnukleinsäure aus humanen respiratorischen Proben (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngeal-spülung/-abstrich, Oropharyngealabstrich, bronchoalveoläre Lavage), die zuvor mittels RT-PCR-Methoden z.B. der GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) positiv auf SARS-CoV-2 RNA getestet wurde, ist das Ausgangsmaterial für die GSD NovaType II SARS-CoV-2.
- 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 Proben und 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 **NFW** als „No Template Control“ (NTC) wird dringend empfohlen.
- Definieren Sie die Positionen (Vertiefungen) für Proben und Kontrollen (**PC** oder **NFW**) auf der Platte.
- Abhängig vom verwendeten Real-Time PCR Gerät und verfügbaren Detektionskanälen kann RNase P als interne Prozesskontrolle verwendet werden.

Wichtig: Falls das verwendete Real-Time PCR Gerät über keinen ATTO425 Kanal verfügt, darf die RNase P Amplifikation nicht durchgeführt werden, d.h. das Reaktions-Setup muss **ohne** **PP IPC** Primer-Probe-Mix pipettiert werden, da sonst unspezifische Signale in den anderen Detektionskanälen auftreten können.

Reaktions-Setup		
Komponente	einschließlich RNase P Amplifikation (ATTO425 Kanal erforderlich)	ohne Amplifikation der RNase P
E-MIX	5 µL	5 µL
PP VAR	2 µL	2 µL
PP IPC	1 µL	-
NFW	-	1 µL
Probe oder PC oder NFW	12 µL	12 µL
Gesamtvolumen	20 µL	20 µL

- Verschießen Sie die optische 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 II SARS-CoV-2 RT-PCR, wenden Sie sich bitte an NovaTec Immundiagnostica GmbH.

Einstellungen RT-PCR Lauf	
Reaktionsvolumen	20 µL
Passive Referenz	Keine

Fluoreszenz-Detektoren / Fluorophore

Die Detektion des amplifizierten viralen Nukleinsäurefragments erfolgt in den Detektionskanälen FAMTM (S Gen-Mutation N501Y), HEXTM (S-Gen N501 Wildtyp und Mutation K417N) und CY5TM (S Gen-Mutation E484K; Fluorophor: ATTO647) mit MGBEQ Quencher.

Die Detektion der amplifizierten internen Prozesskontrolle RNase P erfolgt im Detektionskanal ATTO425 mit BHQ1 Quencher.

Detektion	Wildtyp	B.1.1.7 (501Y.V1)	B.1.351 (501Y.V2)	P.1 (501Y.V.3)
K417N Mutation	-	-	HEX TM	-
E484K Mutation	-	-	CY5 TM	CY5 TM
N501Y Mutation	HEX TM (wildtype)	FAM TM	FAM TM	FAM TM
RNaseP*	ATTO425	ATTO425	ATTO425	ATTO425

* Der Nachweis von RNase P ist nur möglich, wenn das verwendete Real-Time PCR Gerät mit dem entsprechenden Detektionskanal (ATTO425) ausgestattet ist und der **PP** **IPC** Primer-Probe-Mix dem Reaktions-Setup hinzugefügt wird.

Temperaturprofil und Datenerfassung

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit (min)	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. Interpretation der Ergebnisse

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

Das GSD NovaType II SARS-CoV-2 Testprotokoll schreibt vor, dass die Kontrollen vor den Ergebnissen der Proben analysiert werden müssen.

8.1.1. Kontrollen

Wenn die Kit-Kontrolle(n) versagen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Daten von Proben dürfen erst dann analysiert und interpretiert werden, wenn alle Kit-Kontrollen valide Ergebnisse zeigen.

- NTC (no template control): darf KEINEN nachweisbaren Ct in den S Gen- oder RNase P-Reaktionen aufweisen. Wenn diese Kontrolle in einer der Vertiefungen einen nachweisbaren Ct-Wert aufweist, deutet dies auf eine Kontamination des PCR-Laufs hin und er wird als invalide und muss wiederholt werden.
- **PC**: Ct ≤ 38 für alle S Gen Targets (HEXTM, FAMTM and Cy5TM)
- Interne Prozesskontrolle (RNase P): alle humanen Proben sollten Ct Werte Ct ≤ 38 aufweisen, was auf das Vorhandensein des humanen RNase P Gens hinweist.

Ein Fehlschlagen des RNase P Nachweises in einer Probe kann ein Hinweis sein auf:

- Unsachgemäße Nukleinsäure-Extraktion, was zu Verlust von RNA und/oder RNA Degradation führt.
- Fehlen von ausreichend humanem Zellmaterial aufgrund falscher Entnahme oder Verlust der Probenintegrität.
- (RT-) PCR-Inhibition.
- Unsachgemäßes Reaktions-Setup und Ausführung.
- Fehlfunktion von Reagenzien oder Geräten.

Wenn die RNase P Reaktion kein positives Ergebnis für die Proben liefert, muss wie folgt interpretiert werden:

- Wenn die S Gen-Marker auch bei fehlendem positivem RNase P positiv sind, sollte das Ergebnis als valide angesehen werden. Es ist möglich, dass einige Proben aufgrund geringer Zellzahlen in der Originalprobe keine RNase P-Amplifikation aufweisen. Ein negatives RNase P-Signal schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA in einer Probe nicht aus.
- Wenn alle S Gen Marker UND RNase P für die Probe negativ sind, sollte das Ergebnis für die Probe als invalide bewertet werden. Wenn eine Restprobe vorhanden ist, sollten das Extraktionsverfahren und der Test wiederholt werden. Wenn alle Marker nach dem erneuten Test negativ bleiben, ist das Ergebnis als invalide zu bewerten und es sollte nach Möglichkeit eine neue Probe entnommen werden.

8.1.2. Proben

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		Detection Channel			
S Gen	Variante	HEX™	FAM™	CY5™	ATTO425* (interne Prozesskontrolle)
N501	Wildtyp	POS	neg	neg	POS
N501Y	B.1.1.7 (501Y.V1)	neg	POS	neg	POS
K417N, E484K, N501Y	B.1.351 (501Y.V2)	POS	POS	POS	POS
E484K, N501Y	P.1 (501Y.V.3)	neg	POS	POS	POS

* Das RNase P-Gen wird als interne Prozesskontrolle verwendet, da viele Kopien davon im menschlichen Genom vorhanden sind und es leicht nachweisbar ist. Die RNase P stammt aus den menschlichen Zellen, die in jeder verwendeten Probe vorhanden sind. Wenn menschliche Nukleinsäuren zum Nachweis des humanen Gens RNase P extrahiert wurden, wird davon ausgegangen, dass auch die viralen Nukleinsäuren erfolgreich extrahiert wurden.

Das RNase P Target wird auch als Qualitätskontrolle für die Extraktionsmethode und zur Bestätigung der Abwesenheit von PCR-Inhibitoren in der Probe amplifiziert.

Die Unterscheidung von Virusvarianten im Hinblick auf die S Gen-Codons 417, 484 und 501 ist nur möglich für Proben,

- die bereits positiv auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA getestet wurden und
- deren Ct-Wert(e) in dem/den entsprechenden S Gen-Kanal/Kanälen gleich oder kleiner 38 (Ct ≤ 38) ist/sind.

Hinweis zu Variante B.1.1.7:

1. Andere Veränderungen im Spike-Protein, z.B. Deletion 69-70, haben keinen Einfluss auf die vorliegende RT-PCR, da diese Veränderungen weit von den detektierten Targets entfernt liegen.
2. Mit dem vorliegenden Setup können B.1.1.7-Varianten, die eine zusätzliche E484K-Mutation tragen, nicht von der P.1-Variante unterschieden werden, da beide Signale in den Kanälen FAM™ und Cy5™ zeigen.

9. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

10. 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.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- **NUR FÜR FORSCHUNGSZWECKE. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.**
- Alle Proben humanen Ursprungs sollten als potenziell 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. Beachten Sie hierzu unbedingt die Angaben in der Gebrauchsanleitung des Extraktionskits v.a. in Bezug auf unterschiedliche Probenmaterialien!
- 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.

11.1. 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.

12. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer:	PCOV6083T	GSD NovaType II SARS-CoV-2	(1 x 96 Bestimmungen)
	PCOV6084T	GSD NovaType II SARS-CoV-2	(4 x 96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 - increased circulation of variants of concern and vaccine rollout in the EU/EEA, 14th update – 15 February 2021. ECDC: Stockholm; 2021.

Robert Koch-Institut (2021): RKI - Coronavirus SARS-CoV-2 - SARS-CoV-2: Virologische Basisdaten sowie Virusvarianten. Available online at https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html, updated on 2/23/2021, checked on 3/16/2021.

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
	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.
	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
	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
	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
	Primer-Probe-Mix (for discrimination of variants / zur Unterscheidung von Varianten / pour la discrimination des variants / per discriminare le varianti / para discriminar variantes / para discriminação de variantes)
	Primer-Probe-Mix (for detection of RNase P / zum Nachweis von RNase P / pour la détection de RNase P / per il rilevamento di RNase P / Para la detección de la RNase P / para detecção do RNase P)
	Nuclease free water / Nukleasefreies Wasser / Eau sans nuclease / Acqua priva di nucleosi / Agua libre de nucleasas / Água isenta de Nuclease
	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle positif / Controllo positivo / Control positivo / Controle positivo
	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

PCOV608x_RUO_rev01_20210330