

# **GSD NovaType Select L452R**

## **SARS-CoV-2**

### **RT-PCR**

**RUO**

**FOR RESEARCH USE ONLY**  
**Not for use in diagnostic procedures**

English .....	2
Deutsch.....	7
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:	PCOVL452R3 PCOVL452R4	(1 x 96 Determinations) (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.

Gene mutations in emerging SARS-CoV-2 variants can affect transmission, virulence, and immunity. Variants for which there is evidence (variants of concern, VOC) or suspicion (variants of interest, VOI) of increased transmissibility, more severe disease (e.g., increased hospitalizations or deaths), significant reduction in neutralization by antibodies, reduced efficacy of treatments or vaccines, or diagnostic detection errors are considered to be under special surveillance worldwide. Current VOCs and VOIs include the lineages, B.1.1.7 (501Y.V1), B.1.351 (20H/501Y.V2), B.1.1.28 (P.1; 20J/501Y.V3), B.1.617 (G/452.V3) and B.1.427/B.1.429 (CAL.20C). They all exhibit mutations in the spike protein that are associated with increased transmissibility and/or suspected to negatively affect vaccine efficacy by avoiding the immune response. The lineages B.1.617 (G/452.V3) and B.1.427/B.1.429 (CAL.20C) are both found to be carrier of the mutation L452R in addition to other mutations. This mutation is suspected to be associated with both increased infectivity and reduced immune response and is therefore of relevance to the global pandemic situation.

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 Select L452R SARS-CoV-2 is a research use only (RUO) real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) assay designed for the qualitative detection of the SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) S gene mutation L452R. 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 Select L452R 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 molecules for amplification and simultaneous detection of the specific RNA sequence representing the **SARS-CoV-2 S gene mutation L452R**. The S gene specific probe is labelled with the fluorophore FAM™. As internal process control, the human Ribonuclease P (RNase P) is detected using an CY5™ labelled probe. 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 Select L452R SARS-CoV-2 has been validated for following real-time PCR platforms:

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

### 4. MATERIALS

---

#### 4.1. Reagents Provided

Cap	Symbol	Component	PCOVL452R3 (PCOVL452R4)	
			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/white	PP   L452R	Primer-Probe-Mix (for detection of mutation L452R and for detection of RNase P gene)	350	1 (4)
red	PC	Positive Control (plasmid DNA representing SARS-CoV-2 S gene mutation L452R)	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 Select L452R 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 Select L452R 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.
- Protect E-MIX and PP | L452R from light and keep frozen until use.

### 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 Select L452R SARS-CoV-2.
- The quality and the quantity 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.

Reaction Setup	
Component	Volume
<b>E-MIX</b>	5 µL
<b>PP L452R</b>	3 µL
Sample or <b>PC</b> or <b>NFW</b>	12 µL
<b>Total Volume</b>	<b>20 µL</b>

- 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 Select L452R SARS-CoV-2 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 for the S gene mutation L425R is performed in the FAM™ detection channel with MGBEQ Quencher. Detection of the amplified internal process control RNase P is performed in the detection channel CY5™ with BHQ2 Quencher.

Target	Fluorophore/Detection Channel	Quencher
S gene L452R	FAM™	MGBEQ
RNase P	CY5™	BHQ2

#### 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"><li>• Above the background</li><li>• Below the plateau and linear regions of the amplification curve</li><li>• Within the exponential phase of the amplification curve</li></ul>
Baseline	Select start and end cycle values so that possible initial signal noise is not included and the baseline ends before significant fluorescence is detected.

### 8.1. Interpretation of Results

The test run is valid only if the RT-PCR run is complete.

The GSD NovaType Select L452R 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 S gene L452R target (FAM™)
- 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 marker is 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 amplification curves due to low copy numbers in the original sample. A negative RNase P signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA in a specimen.
- If the S gene marker 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

The probe for detection of the S gene L452R mutation is labelled with FAM™. The probe for detection of the RNase P gene is labelled with CY5™. Please refer to the following table for interpretation of different signal combinations.

Detection Channel		Interpretation of Results
FAM™ (L452R)	CY5™ (RNase P)	
Positive	Positive or Negative	S gene L452R mutation detected
Negative	Positive	S gene L452R mutation not detected. This result is an indication of the presence of the L452 wildtype sequence due to the positive result in the preceding SARS-CoV-2 RT-PCR screening assay
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. A diagnostic statement must not be made. The RT-PCR run should be repeated or a new sample must be analyzed.

## 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 Select L452R SARS-CoV-2 test runs with negative signals. However, such results do not exclude the presence of SARS-CoV-2 RNA and therefore do not exclude the presence of a L452R mutation.

## **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.:	PCOVL452R3	GSD NovaType Select L452R SARS-CoV-2	(1 x 96 Determinations)
	PCOVL452R4	GSD NovaType Select L452R 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 Bindegewebe 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-Glycoprotein (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.

Genmutationen in neu auftretenden SARS-CoV-2-Varianten können sich auf die Übertragung, Virulenz und Immunität auswirken. Varianten, für die es Nachweise (variants of concern, VOC) oder Verdachtsmomente (variants of interest, VOI) für eine erhöhte Übertragbarkeit, eine schwerere Erkrankung (z.B. vermehrte Krankenhausaufenthalte oder Todesfälle), eine signifikante Verringerung der neutralisierenden Wirkung von Antikörpern, eine verminderte Wirksamkeit von Behandlungsmethoden oder Impfstoffen gibt oder es zu Fehlern bei der Diagnostik kommt, gelten weltweit als besonders überwachungsbedürftig. Aktuelle VOCs und VOIs umfassen die Linien B.1.1.7 (501Y.V1), B.1.351 (20H/501Y.V2), B.1.1.28 (P.1; 20J/501Y.V3), B.1.617 (G/452.V3) und B.1.427/B.1.429 (CAL.20C). Sie alle weisen Mutationen im Spike-Protein auf, die mit einer erhöhten Übertragbarkeit assoziiert sind und/oder im Verdacht stehen, die Wirksamkeit des Impfstoffs durch Umgehung der Immunantwort negativ zu beeinflussen. Die Linien B.1.617 (G/452.V3) und B.1.427/B.1.429 (CAL.20C) sind neben anderen Mutationen auch Träger der Mutation L452R. Es wird vermutet, dass diese Mutation sowohl mit einer erhöhten Infektiosität als auch mit einer verminderten Immunantwort einhergeht und daher für die globale Pandemiesituation von Bedeutung ist.

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 Bindegewebe 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 Select L452R SARS-CoV-2 ist ein Real-Time Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktions-Assay (RT-PCR) nur für Forschungszwecke (Research Use Only, RUO), der für den qualitativen Nachweis der SARS-CoV-2 („Schweres Akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) S-Gen Mutation L452R entwickelt wurde. 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 Select L452R 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 Reporterfarbstoffen und Quenchern zur Amplifikation und zum gleichzeitigen Nachweis der spezifischen RNA-Sequenz, welche die **SARS-CoV-2 S Gen-Mutation L452R** repräsentiert, markiert sind. Die für das S-Gen spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor FAM™ markiert. Als interne Prozesskontrolle wird das humane Ribonuclease P (RNase P) Gen mit einer CY5™-markierten Sonde nachgewiesen. 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 Select L452R SARS-CoV-2 wurde für folgende Real-Time PCR Plattformen validiert:

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

## 4. MATERIALIEN

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	PCOVL452R3 (PCOVL452R4)	
			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/weiß	PP   L452R	Primer-Probe-Mix (zum Nachweis der Mutation L452R und des RNase P Gens)	350	1 (4)
rot	PC	Positive Control (Plasmid-DNA, die die SARS-CoV-2 S Gen-Mutation L452R 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 Select L452R 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 Select L452R 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 und PP | L452R vor Licht schützen und bis zur Verwendung tiefgekühlt aufbewahren.

## 6. VORBEREITUNG DER PROBEN

- Exstriierte RNA oder Gesamtnukleinsäure aus humanen respiratorischen Proben (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngealspülung/-abstrich, Oropharyngealabstrich, bronchoalveolare 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 Select L452R SARS-CoV-2.
- Die Qualität und Quantität 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.

Reaktions-Setup	
Komponente	Volumen
<b>E-MIX</b>	5 µL
<b>PP   L452R</b>	3 µL
Probe oder <b>PC</b> oder <b>NFW</b>	12 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µL</b>

- Verschließen 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 Select L452R SARS-CoV-2, 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 für die S Gen-Mutation L452R erfolgt im FAM™ Detektionskanal mit MGBEQ Quencher. Die Detektion der amplifizierten internen Prozesskontrolle RNase P erfolgt im Detektionskanal CY5™ mit BHQ2 Quencher.

Target	Fluorophor/Detektionskanal	Quencher
S Gen L452R	FAM™	MGBEQ
RNAse P	CY5™	BHQ2

### 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"><li>• Oberhalb des Hintergrunds</li><li>• Unterhalb des Plateaus und der linearen Bereiche der Amplifikationskurve</li><li>• Innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve</li></ul>
Basislinie	Wählen Sie Start- und Endzykluswerte so, dass ein mögliches anfängliches Signalrauschen nicht eingerechnet wird, und 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 Select L452R 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 S Gen L452R Target (FAM™)
- 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 der S Gen-Marker auch bei fehlendem positivem RNase P positiv ist, 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 der 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

Die Sonde zum Nachweis der S-Gen Mutation L452R ist mit FAM™ markiert. Die Sonde für den Nachweis des RNase P Gens ist mit CY5™ markiert. Die Interpretation der verschiedenen Signalkombinationen ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Detektionskanal		Interpretation der Ergebnisse
FAM™ (L452R)	CY5™ (RNase P)	
Positiv	Positiv oder Negativ	S Gen Mutation L452R detektiert
Negativ	Positiv	S Gen Mutation L452R nicht detektiert. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die L452 Wildtyp-Sequenz.
Negativ	Negativ	PCR-Inhibition oder Versagen der Reagenzien. Eine diagnostische Aussage darf nicht getroffen werden. Der Testlauf sollte wiederholt werden oder es muss eine neue Probe analysiert werden.

## **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 Select L452R SARS-CoV-2 Testläufen mit negativen Signalen führen. Solche Ergebnisse schließen jedoch das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA nicht aus und somit auch nicht das Vorliegen einer L452R-Mutation.

## **10. MARKENZEICHEN UND HAFTUNGSAUSSCHLÜSSE**

---

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 angegebenem 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 Sammelrörchen 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:	PCOVL452R3	GSD NovaType Select L452R SARS-CoV-2	(1 x 96 Bestimmungen)
	PCOVL452R4	GSD NovaType Select L452R 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](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**

Ct/Cq	Threshold cycle (Ct) or quantification cycle (Cq) is the cycle number at which the sample's reaction curve intersects the threshold line
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 detection of mutation L452R and for detection of RNase P gene / zum Nachweis der Mutation L452 und des RNase P Gens / pour la detection de la mutation L452R et pour la détection de la RNase P / per il rilevamento della mutazione L452R e per il rilevamento del gene RNase P / para la detección de la mutación L452R y para la detección del gen RNase P / para detecção da mutação L452R e para detecção do gene 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 / Contenuto sufficiente 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

PCOVL452Rx\_RUO\_rev01\_20210518