

GSD NovaPrime[®]

SARS-CoV-2 (COVID-19)

RT-PCR



For in-vitro diagnostic use only

English	2
Deutsch.....	8
Bibliography / Literatur.....	15
Symbols Key / Symbolschlüssel.....	16

Product Number:	PCOV6033	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6034	(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).

Currently, there is no specific treatment for SARS-CoV-2 infection established; an approved vaccine is not yet available.

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

The presence of pathogen or infection may be identified by

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

2. INTENDED USE

The GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) RT-PCR is intended for the qualitative determination of SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) genomic RNA extracted from human respiratory (nasal wash/swab, nasopharyngeal wash/swab, oropharyngeal swab and bronchoalveolar lavage) specimen types.

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 **two specific regions of the SARS-CoV-2 N gene**. Furthermore, the assay contains a heterologous amplification target (Extraction Control, **EC**) to identify possible RT-PCR inhibition by interfering substances contained in the sample or failure of the preceding RNA extraction. Therefore, the **EC** is added to the specimen during RNA isolation.

The gene of interest specific probes are labelled with the fluorophore FAM™. The **EC** specific probe is labelled with the fluorophore Cy5™ thereby allowing parallel detection of both amplicons in the corresponding detection channels.

The GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) RT-PCR has been validated for following real-time PCR platforms:

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

4. MATERIALS

4.1. Reagents Provided

Cap	Symbol	Component	Volume per Vial [µL]	Number of Vials	
				PCOV6033	PCOV6034
green	E-MIX	RT-PCR Enzyme Mix (reverse transcriptase, hot-start DNA polymerase, RNase inhibitor, nucleotides, magnesium, stabilizers and buffer)	750	1	4
blue	PP	Primer-Probe-Mix	1100	1	4
yellow	EC	Extraction Control (RNA-based internal lysis, extraction and amplification control)	500	1	4
red	PC	Positive Control (plasmid DNA representing the N gene of SARS-CoV-2)	100	1	4
transparent	NFW	Nuclease Free Water	500	1	4

4.2. Materials and Equipment needed, but not provided

- Real-Time PCR instrument (for already validated instruments refer to 3.PRINCIPLE OF THE ASSAY)
- Equipment and consumables for isolating virus RNA from respiratory specimens (see 9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS)
- Appropriate Real-Time PCR consumables (e.g. 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 NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) kit is shipped on dry ice and all components should arrive frozen.

- All components have to be stored at -20 °C immediately after arrival.
- Repeated freeze thaw cycles (more than two) of reagents should be avoided, since this might affect the performance of the kit. Reagents should be frozen in aliquots if they are used intermittently.
- Keep unfrozen storage (e.g. storage on ice) as short as possible.
- Keep the **E-MIX** and the **PP** in the freezer, until you are ready to use it.
- Protect **E-MIX** and the **PP** from light.

6. SAMPLE PREPARATION

- Extracted RNA or total nucleic acid is the starting material for the GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) kit. 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.
- For nucleic acid extraction a method suitable for extracting virus RNA from human respiratory specimen should be used.
- The **EC** can be used for monitoring both the RNA extraction procedure and any potential PCR inhibition. Therefore, the **EC** has to be added prior to the nucleic acid extraction procedure. Independent of the method / system used for nucleic acid extraction, the **EC** can be directly added to the specimen.
- About 5 µL **EC** may be suitable, but should be carefully evaluated. Excess amounts of **EC** may lead to a reduced amplification of the SARS-CoV-2 specific sequences, and might therefore result in increased FAM™ Ct values. Underestimation of the SARS-CoV-2 specific signal may occur. Please refer to table in section 8.2.
- 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.

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.
- It is highly recommended to test samples and controls in triplicates.
- Pipette **E-MIX** slowly and 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	
E-MIX	7.5 µL
PP	10.5 µL
Sample or PC or NFW	12 µL
Total volume	30 µL

- Close the optical 96-well 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.

RT-PCR Run Settings	
Reaction Volume	30 µL
Ramp Rate	Standard or Fast
Passive Reference	ROX™

Fluorescent Detectors/Dyes

Detector	Dye	Quencher
SARS-CoV-2 RNA	FAM™	None
Extraction Control EC	Cy5™	None

Temperature Profile and Data Collection

No. of Cycles	Temperature	Time	Data Collection
1	25 °C	2 min	-
1	50 °C	30 min	-
1	95 °C	2 min	-
40	95 °C	15 sec	-
	60 °C	1 min	Fluorescence measurement at the end of every cycle

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

8. RESULTS

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

Analysis settings:

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

8.1. Run Validation Criteria

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

The GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) test protocol dictates that the controls be analyzed before patient sample results.

The **PC**, **EC** and NTC Ct values must meet the acceptance criteria in the table below for the assay to be valid.

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

Validation Criteria	Result/Acceptable Ct	Valid/Invalid	Measure
NTC	not detected (ND)	valid	-
	Ct ≤ 40	invalid	Repeat test run
PC	FAM™ Ct ≤ 38 no Cy5™ signal	valid	-
	FAM™ Ct > 38	invalid	Repeat test run
EC	Cy5™ Ct ≤ 35	valid	-
	Cy5™ Ct > 35 and FAM™ Ct > 38	Sample result invalid	Repeat extraction and test run

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

8.2. Interpretation of Results

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

Detection Channel		Interpretation of Results
FAM™	Cy5™	
Positive Ct ≤ 38	Positive or Negative	The sample contains SARS-CoV-2 specific RNA.
Negative Ct > 38	Positive Ct ≤ 35*	The sample does not contain detectable amounts of SARS-CoV-2 specific RNA (* refer to section 6.).
Negative Ct > 38	Negative Ct > 35	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.

Diagnosis of an infectious disease should not be established only on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as laboratory diagnostics.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The determinations of the specific performance characteristics were done on ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) in standard mode using a threshold setting of 0.1 (7500 Software v2.3).

To establish performance characteristics, RNA extraction was performed using the bioMérieux NucliSENS® easyMAG® or EMAG® instrument.

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

Use of other Real-Time PCR instruments or RNA extraction methods must be validated by the user. During validation a suitable **EC** volume which has to be added during RNA extraction has to be determined to obtain a valid Cy5™ signal as shown in table under 8.1. Run Validation Criteria.

For further information about the specific performance characteristics, please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

9.1. Precision

Precision data for specific RNA

SARS-CoV-2	n run per day / replicates	Mean [Ct] (day 1 / 2 / 3)	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability				
High positive sample	1 / 3	15.35 / 15.82 / 15.84	0.16 / 0.04 / 0.12	0.39 / 0.24 / 0.73
Medium positive sample	1 / 3	21.47 / 21.70 / 21.79	0.16 / 0.43 / 0.11	0.74 / 0.43 / 0.52
Low positive sample	1 / 3	27.30 / 27.27 / 27.55	0.21 / 0.01 / 0.01	0.75 / 0.04 / 0.05
Inter-Assay Variability				
High positive sample	3 / 9	15.67	0.10	0.67
Medium positive sample	3 / 9	21.65	0.12	0.56
Low positive sample	3 / 9	27.37	0.08	0.28

9.2. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is expressed as Limit of Detection (LoD).

	LoD [copies/reaction]
Standard cycling	3.75

9.3. Inclusivity

The analytical sensitivity of the GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) is first and foremost ensured by the thorough selection of the oligonucleotides. Inclusivity was evaluated by *in silico* analysis using all publicly available SARS-CoV-2 sequences (available on the 26th of April 2020) to determine the percent identity matches for targeted sequences of the GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) assay. In total 73 SARS-CoV-2 genome sequences have been analyzed by alignment to primers and probes.

9.4. Cross-Reactivity

Cross-reactivity was evaluated by *in silico* analysis against normal flora or pathogens that cause similar symptoms or pathogens related to SARS-CoV-2. Primer-probe-sets not exceeding 80 % identity to a potential cross-reacting sequence are not predicted to cause a cross-reaction.

In addition to *in silico* analysis, the GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) assay was performed on nucleic acid from respiratory pathogens including coronavirus 229E, coronavirus NL63, coronavirus OC43, and SARS. All these pathogens tested by the GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) assay did not generate detectable amplification signals.

9.5. Negative and Positive Percent Agreement (NPA, PPA)

30 defined negative and 30 defined positive samples have been tested. 100 % agreement was achieved for all 60 samples tested.

10. QUALITY CONTROL

In accordance with NovaTec Immundiagnostica GmbH ISO-certified Quality Management System, each lot of GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) has been tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

11. TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

ABI Prism® (Applied Biosystems™), (ThermoFisher Scientific)

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

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kit with other analyzers than the ones mentioned in section 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- 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.

12.1. Disposal Considerations

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

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:	PCOV6033	GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19)	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6034	GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19)	(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).

Gegenwärtig gibt es keine spezifische Behandlung der SARS-CoV-2-Infektion; ein zugelassener Impfstoff ist noch nicht verfügbar.

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-Nachweis: z.B. RT-PCR
- Serologie: Nachweis von Antikörpern durch z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Die GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) RT-PCR ist für die qualitative Bestimmung genomischer RNA von SARS-CoV-2 („Schweres Akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) bestimmt, die aus humanen respiratorischen Proben (Nasenspülung / -abstrich, Nasopharyngealspülung / -abstrich, Oropharynxabstrich und bronchoalveoläre Lavage) extrahiert wurde.

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 **zwei spezifische Regionen des SARS-CoV-2 N-Gens** repräsentieren, markiert sind. Darüber hinaus enthält der Assay ein heterologes Amplifikationstarget (Extraktionskontrolle, **EC**) zur Identifizierung einer möglichen RT-PCR-Inhibition durch in der Probe enthaltene Störsubstanzen oder ein Versagen der vorhergehenden RNA-Extraktion. Daher wird die **EC** während der RNA-Isolierung der Probe zugesetzt. Die für das zu detektierende Gen spezifischen Sonden sind mit dem Fluorophor FAM™ markiert. Die für die **EC** spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor Cy5™ markiert, wodurch die parallele Detektion beider Amplicons in den entsprechenden Detektionskanälen ermöglicht wird.

Die GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) RT-PCR wurde für die folgenden Real-Time PCR Plattformen validiert:

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

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	Volumen pro Röhrchen [µL]	Anzahl Röhrchen	
				PCOV6033	PCOV6034
grün	E-MIX	RT-PCR Enzym-Mix (Reverse Transkriptase, Hot-Start DNA Polymerase, Rnase-Inhibitor, Nukleotide, Magnesium and Stabilisatoren in Puffer)	750	1	4
blau	PP	Primer-Sonden-Mix	1100	1	4
gelb	EC	Extraktionskontrolle (RNA-basierte interne Lyse-, Extraktions- und Amplifikationskontrolle)	500	1	4
rot	PC	Positivkontrolle (Plasmid-DNA, die das SARS-CoV-2 N-Gen enthält)	100	1	4
transparent	NFW	Nukleasefreies Wasser	500	1	4

4.2. Erforderliche Materialien und Geräte, nicht mitgeliefert

- Real-Time PCR-Gerät (für bereits validierte Geräte siehe 3. TESTPRINZIP)
- Ausstattung und Verbrauchsmaterial zur Isolierung von Virus-RNA aus respiratorischem Probenmaterial (siehe 9. TESTMERKMALE)
- Geeignete Real-Time PCR-Verbrauchsmaterialien (z.B. 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 NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Kit wird auf Trockeneis versandt und alle Komponenten sollten in gefrorenem Zustand ankommen.

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

6. VORBEREITUNG DER PROBEN

- Extrahierte RNA oder Gesamtnukleinsäure ist das Ausgangsmaterial für den GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Kit. 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.
- Für die Nukleinsäureextraktion sollte eine Methode verwendet werden, die für die Extraktion von Virus-RNA aus humanen respiratorischen Proben geeignet ist.
- Die **EC** kann sowohl zur Überwachung des RNA-Extraktionsverfahrens als auch zur Überwachung einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Daher muss die **EC** vor dem Nukleinsäureextraktionsverfahren zugegeben werden. Unabhängig von der Methode/dem System, das für die Nukleinsäureextraktion verwendet wird, kann die **EC** direkt der Probe zugesetzt werden.
- Etwa 5 µL **EC** können geeignet sein; dies sollte aber sorgfältig evaluiert werden. Ein Überschuss an **EC** kann zu einer verringerten Amplifikation der SARS-CoV-2-spezifischen Sequenzen und somit zu erhöhten FAM™ Ct-Werten führen. SARS-CoV-2 spezifische Signale könnten unterbewertet werden. Bitte beachten Sie die Tabelle in Abschnitt 8.2.
- Da Ethanol ein starker Inhibitor für die Real-Time PCR ist, muss es vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig entfernt werden. Bei Verwendung von „Spin Column“ Kits, die Waschpuffer mit 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.

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.
- Es wird dringend empfohlen, Proben und Kontrollen in Triplikaten zu testen.
- Pipettieren Sie den **E-MIX** langsam und vorsichtig und verwenden Sie Pipettenspitzen, die zum 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	
E-MIX	7,5 µL
PP	10,5 µL
Probe oder PC oder NFW	12 µL
Gesamtvolumen	30 µL

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

7.2. Programmierung des Real-Time PCR-Geräts

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

Einstellungen RT-PCR Lauf	
Reaktionsvolumen	30 µL
Ramp Rate	Standard oder Fast
Passive Referenz	ROX™

Fluoreszenz-Detektoren/Farbstoffe

Detektor	Farbstoff	Quencher
SARS-CoV-2 RNA	FAM™	kein
Extraktionskontrolle EC	Cy5™	kein

Temperaturprofil und Datenerfassung

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Datenerfassung
1	25 °C	2 min	-
1	50 °C	30 min	-
1	95 °C	2 min	-
40	95 °C	15 sec	-
	60 °C	1 min	Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus

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

8. ERGEBNISSE

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

Analyse-Einstellungen:

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

8.1. Testgültigkeitskriterien

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

Das GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Testprotokoll schreibt vor, dass die Kontrollen vor den Ergebnissen der Patientenproben analysiert werden müssen. Die Ct-Werte der **PC**, **EC** und NTC müssen die Akzeptanzkriterien in der nachstehenden Tabelle erfüllen, damit der Test gültig ist.

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

Validierungskriterien	Ergebnis/zulässiger Ct	Valide/Invalide	Maßnahme
NTC	nicht detektiert (ND)	valide	-
	Ct ≤ 40	invalide	Testlauf wiederholen
PC	FAM™ Ct ≤ 38 kein Cy5™ Signal	valide	-
	FAM™ Ct > 38	invalide	Testlauf wiederholen
EC	Cy5™ Ct ≤ 35	valide	-
	Cy5™ Ct > 35 und FAM™ Ct < 38	Probenergebnis invalide	Extraktion und Testlauf wiederholen

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

8.2. Interpretation der Ergebnisse

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

Detektionskanal		Interpretation der Ergebnisse
FAM™	Cy5™	
Positiv Ct ≤ 38	Positiv oder Negativ	Die Probe enthält SARS-CoV-2 spezifische RNA.
Negativ Ct > 38	Positiv Ct ≤ 35*	Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen SARS-CoV-2 spezifischer RNA (*siehe Abschnitt 6.).
Negativ Ct > 38	Negativ Ct > 35	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.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Grundlage eines einzigen Testergebnisses gestellt werden. Für eine präzise Diagnose müssen die klinische Anamnese, die Symptomatik sowie die Laborbefunde berücksichtigt werden.

9. TESTMERKMALE

Die Bestimmungen der spezifischen Testmerkmale wurden auf ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS (Applied Biosystems™) im Standardmodus (7500 Software v2.3) und einer Schwellenwert-Einstellung von 0,1 durchgeführt.

Zur Bestimmung der Testmerkmale wurde die RNA-Extraktion mit dem bioMérieux NucliSENS® easyMAG® oder EMAG® Gerät durchgeführt.

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; dies sind keine garantierten Spezifikationen.

Die Verwendung anderer Real-Time PCR-Geräte oder RNA-Extraktionsmethoden muss vom Anwender validiert werden.

Während der Validierung muss ein geeignetes **EC**-Volumen bestimmt werden, das während der RNA-Extraktion zugegeben werden muss, um ein gültiges Cy5™-Signal zu erhalten, wie in der Tabelle unter 8.1. Testgültigkeitskriterien dargestellt.

Für weitere Informationen zu den spezifischen Testmerkmalen wenden Sie sich bitte an die NovaTec Immundiagnostica GmbH.

9.1. Präzision

Präzisionsdaten für spezifische RNA

SARS-CoV-2	n Testläufe pro Tag / Replikate	Mittelwert [Ct] (Tag 1 / 2 / 3)	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität				
Hoch positive Probe	1 / 3	15,35 / 15,82 / 15,84	0,16 / 0,04 / 0,12	0,39 / 0,24 / 0,73
Positive Probe	1 / 3	21,47 / 21,70 / 21,79	0,16 / 0,43 / 0,11	0,74 / 0,43 / 0,52
Schwach positive Probe	1 / 3	27,30 / 27,27 / 27,55	0,21 / 0,01 / 0,01	0,75 / 0,04 / 0,05
Inter-Assay Variabilität				
Hoch positive Probe	3 / 9	15,67	0,10	0,67
Positive Probe	3 / 9	21,65	0,12	0,56
Schwach positive Probe	3 / 9	27,37	0,08	0,28

9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wird als Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ausgedrückt.

	LoD [Kopien/Reaktion]
"Standard Cycling"	3,75

9.3. Inklusivität

Die analytische Sensitivität des GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Assays wird in erster Linie durch die sorgfältige Auswahl der Oligonukleotide gewährleistet. Die Inklusivität wurde durch *in silico*-Analyse unter Verwendung aller öffentlich verfügbaren SARS-CoV-2-Sequenzen (verfügbar am 26. April 2020) bewertet, um die prozentualen Identitätsübereinstimmungen für Zielsequenzen des GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Tests zu bestimmen. Insgesamt wurden 73 SARS-CoV-2-Genomsequenzen durch Abgleich mit Primern und Sonden analysiert.

9.4. Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität wurde durch *in silico*-Analyse gegen normale Flora oder Pathogene, die ähnliche Symptome verursachen, oder Pathogene, die mit SARS-CoV-2 verwandt sind, untersucht. Primer-Sonden-Sets, die nicht mehr als 80 % Identität mit einer potentiellen kreuzreagierenden Sequenz aufweisen, sind nicht in der Lage, eine Kreuzreaktion auszulösen.

Zusätzlich zu *in silico*-Analysen wurde der GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Assay mit Nukleinsäurematerial von respiratorischen Pathogenen, einschließlich Coronavirus 229E, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43 und SARS durchgeführt. All diese Pathogene, die mit dem GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) getestet wurden, zeigten keine nachweisbaren Amplifikationssignale.

9.5. Negativer und Positiver Prädiktiver Wert (NPA, PPA)

Es wurden 30 definiert negative und 30 definiert positive Proben getestet. Für alle 60 getesteten Proben wurde eine Übereinstimmung von 100 % erzielt.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der NovaTec Immundiagnostica GmbH ist jede Charge des GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) Assays gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

11. MARKENZEICHEN UND HAFTUNGS AUSSCHLÜSSE

ABI Prism® (Applied Biosystems™), (ThermoFisher Scientific)

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

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind strikt zu befolgen. Die Verwendung des Testkits mit anderen als den unter 3. TESTPRINZIP genannten Geräten ist zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Reagenzien nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Beim Umgang mit Proben puderfreie Einweghandschuhe, einen Laborkittel und einen Augenschutz tragen.
- Verwenden Sie immer DNase/RNase-freie Einwegreaktionsgefäße und Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle und Nuklease- (DNase/RNase) Kontamination der Probe und der Kit-Komponenten.
- Um eine Kontamination des Arbeitsbereichs mit Nukleinsäuren zu vermeiden, dürfen Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht geöffnet werden.
- Die RT-PCR ist hochempfindlich gegenüber Nukleinsäurekontaminationen. Daher muss positives/potenziell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits gelagert werden.
- Belassen Sie Verbrauchsmaterial und Ausstattung in den eindeutig zugewiesenen, getrennten Arbeitsbereichen.
- Dieser Assay darf nicht direkt mit der Patientenprobe verwendet werden.
- Vor der Verwendung dieses Assays muss die Nukleinsäure mit geeigneten Extraktionsmethoden aus der Originalprobe extrahiert werden.
- Da Ethanol ein starker Inhibitor der Real-Time PCR ist, muss es vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig eliminiert werden. Bei Verwendung von Spin Columns mit Waschpuffern, die **Ethanol enthalten**, wird dringend empfohlen, vor der Elution der RNA einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von 10 min bei ca. 17000 x g (~ 13000 U/min) durchzuführen. Für diesen zusätzlichen Zentrifugationsschritt ist ein neues Sammelröhrchen zu verwenden.
- Das Ergebnis dieses RT-PCR-Kits kann durch potenzielle Mutationen im Genom des Erregers beeinflusst werden, wenn diese in der Primer-/Sondenbindungsregion liegen. Dies kann zu einer Fehleinschätzung führen und/oder den Erregernachweises erschweren.
- RT-PCR-Inhibitoren können eine zu niedrige Bewertung, falsch negative Ergebnisse oder ungültige Testläufe hervorrufen. Verwenden Sie daher nur Nukleinsäure-Extraktionskits, die RT-PCR-Inhibitoren entfernen und die für nachgeschaltete RT-PCR-Prozesse bestimmt sind.
- Die Real-Time PCR ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das mit der guten Laborpraxis vertraut und in RT-PCR geschult ist.

12.1. Entsorgungshinweise

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

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer:	PCOV6033	GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) (1 x 96 Bestimmungen)
	PCOV6034	GSD NovaPrime® SARS-CoV-2 (COVID-19) (4 x 96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14). bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

Gralinski, Lisa E.; Menachery, Vineet D. (2020): Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. In *Viruses* 12 (2). DOI: 10.3390/v12020135.

RKI (Ed.): SARS-CoV-2 Steckbrief zur Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19).

Available online at https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. (accessed: 13.04.2020)
















Wang, Guan; Jin, Xian (2020): The progress of 2019 novel coronavirus event in China. In *Journal of medical virology* 92 (5), pp. 468–472. DOI: 10.1002/jmv.25705.

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. Interim guidance. 13 March 2020.

Available online at [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected), accessed: 13.04.2020.

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In *Nature* 579 (7798), pp. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL

	Manufactured by / Hergestellt von
	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum
	Lot Number / Chargenbezeichnung
	Expiration Date / Verfallsdatum
	Storage Temperature / Lagertemperatur
	Protect from Light / Vor Licht schützen
	CE Mark / CE-Zeichen
	Catalogue Number / Katalog Nummer
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten
	RT-PCR Enzyme Mix / RT-PCR Enzym-Mix
	Primer-Probe-Mix / Primer-Sonden-Mix
	Nuclease free water / Nukleasefreies Wasser
	Extraction Control / Extraktionskontrolle
	Positive Control / Positivkontrolle
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests



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

PCOV603x-eng,dt-20200605_EH