



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA® GENE SARS-CoV-2 RUO

REF PG6815RUO



Deutsch	3
English	15

Deutsch

RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO

REF PG6815RUO

1. Zweckbestimmung

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Verfahren geeignet.

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO Test, welcher auf real-time PCR Geräten (RIDA®CYCLER, LightCycler®480II, Mx3005P; ABI 7500, CFX96™ und Rotor-Gene Q) durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanen respiratorischen Proben.

Das Produkt ist für den Einsatz durch Fachanwender in Krankenhauslaboren, Referenzlaboren, Privatlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Ende Dezember traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.¹ Anfang Januar konnte von chinesischen Behörden ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Ursache dieser Erkrankungen identifiziert werden.¹ Die durch SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit erhielt den offiziellen Namen COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) und ist von Mensch zu Mensch übertragbar.²

Weltweit wurden bereits 45.171 Fälle gemeldet (Stand: 12.02.2020).³ Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden.⁴ Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.^{1,4}

3. Testprinzip

RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanen respiratorischen Proben.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR-Format, d.h. die Reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für SARS-CoV-2 (E-Gen) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen

werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Novel Coronavirus 2019 RUO Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO multiplex real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für Forschungszwecke.

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben

Für die RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Novel Coronavirus 2019 RUO Test enthält eine **Internal Control RNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control RNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** je Probe

während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen, je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA-Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR-Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Green	-
	ICR	Yellow	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
ABI 7500	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor- Gene Q	SARS-CoV-2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

**1 Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind valide, wenn sie den in der Tabelle angegebenen Bedingungen entsprechen. Der Ct-Bereich für die Positivkontrolle ist auf dem dem Produkt beigelegten Quality Assurance Certificate angegeben. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht die Bedingungen für einen validen Lauf erfüllen, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von		
SARS-CoV-2	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

SARS-CoV-2 ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA und die Internal Control RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

SARS-CoV-2 ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

SARS-CoV-2 ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für humane respiratorische Proben geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
4. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
6. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zielgen (E-Gen) vorhanden ist.

13. Leistungsmerkmale










Nicht zutreffend

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-02-12	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	Für Forschungszwecke
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b> Zugriff am 12.02.2020
3. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html Zugriff am 12.02.2020
4. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020

English

RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO

REF PG6815RUO

1. Intended use

For research use only. Not intended for diagnostic procedures.

RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO test, which will be performed on real-time PCR instruments (RIDA®CYCLER, LightCycler®480II, Mx3005P; ABI 7500, CFX96™ and Rotor-Gene Q), is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) RNA from human respiratory samples.

The product is intended for use by professional users in hospital laboratories, reference laboratories, private laboratories or state laboratories.

2. Summary and explanation of the test

At the end of December in the Chinese metropolis of Wuhan, numerous cases of pneumonia of unknown cause occurred.¹ At the beginning of January, Chinese authorities identified a new type of corona virus (SARS-CoV-2) as the cause.¹ The disease caused by SARS-CoV-2 is officially named COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) and is transmissible from person to person.² Worldwide, 45,171 cases have been reported to date (as of February 12, 2020).³ The initial cases in Germany were confirmed at the end of January 2020.⁴

The WHO declared an international health emergency on January 31, 2020.^{1,4}

3. Test principle

RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) RNA from human respiratory samples.

Detection is done in a one-step real-time RT-PCR format: reverse transcription (RT) and subsequent PCR take place in one reaction vial. In the process, the isolated RNA is transcribed into cDNA with the help of a reverse transcriptase. The specific gene fragments for SARS-CoV-2 (E gene) are then amplified using real-time PCR. The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled at one end with a quencher and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, the Taq-Polymerase separates the reporter from the quencher. The

reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR device. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA®GENE Novel Coronavirus 2019 RUO test contains an Internal Control RNA (ICR) to be able to control sample preparation and/or any potential PCR inhibition.

4. Reagents provided

Table 1: Reagents provided (The reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations.)

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	<u>Reaction Mix</u>	2x	1050 µl	yellow
2	<u>Enzyme Mix</u>	1x	80 µl	red
R	<u>Internal Control RNA</u>	2x	1700 µl	brown
N	<u>No Template Control</u>	1x	450 µl	white
P	<u>Positive Control</u>	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 5 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 RUO multiplex real-time RT-PCR test can be used with the following extraction platforms and real-time PCR devices:

Table 2: Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Real-time PCR devices	
R-Biopharm	RIDA [®] CYCLER
Roche	LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: When using Rotor-Gene Q (QIAGEN), use only 0.1 ml tubes.

Should you have to use other extraction procedures or real-time PCR instruments, please contact R-Biopharm to check the compatibility at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) when using LightCycler[®] 480II
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with rotor for reaction vials or plates
- Vortexer
- Pipettes (0.5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl)
- Pipette tips with filters
- Powder-free disposable gloves
- PCR water (nuclease-free)

7. Precautions for users

For research use only.

- This test must be carried out only by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.
- Always adhere strictly to the user instructions for carrying out this test.
- Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.
- Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.
- Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.
- Ensure that the extraction, PCR preparation, and PCR are carried out in different rooms in order to avoid cross-contaminations.
- Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.
- Dispose of test kit once the expiration date has lapsed.
- Users are responsible for proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

For further details, see the safety data sheets (SDSs) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 RNA preparation from human respiratory samples

A commercially available nucleic acid extraction kit (e.g., RIDA®Xtract (R-Biopharm)) or nucleic acid extraction system (e.g., Maxwell®RSC (Promega)) is recommended for RNA preparation from human respiratory samples. The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA®GENE Novel Coronavirus 2019 RUO test contains an **Internal Control RNA** that indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control RNA** can be used either only as an inhibition control or as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as an inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** must be added to the master mix for each reaction (see Table 4).

If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation **and** as an inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** must be used for each sample during extraction. The **Internal Control RNA** should be added to the sample/lysis buffer mix and should **not** be added directly to the sample material.

We recommend adding 1 µl for each reaction of the **Internal Control RNA** to the PCR mix of the negative control and the positive control.

9. Test procedure

9.1 Master Mix preparation

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive control and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the master mix is recommended in order to balance out the pipette loss (see Table 3, Table 4). Before using the **Reaction Mix**, thaw the **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control**, and **Internal Control RNA**, mix thoroughly and centrifuge for a short time. Always cool reagents appropriately during work steps (2 °C - 8 °C).

Table 3: Example of the calculation and preparation of the master mix for 10 reactions (ICR as extraction and inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

Table 4: Example of the calculation and production of the master mix for ten (10) reactions (ICR only as inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

9.2 Preparation of the PCR Mix

Pipette 20 µl of the master mix into each reaction vial (vial/plate).

Negative control: Pipette 5 µl of the **No Template Control** into the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl eluate to the pre-pipetted master mix.

Positive control: Add 5 µl of the **Positive Control** to the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR mix of the positive control.

Seal the reaction vials or plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer into the real-time PCR device. Start PCR according to PCR instrument set-up (see Table 5, Table 6, Table 7).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time PCR profile

Table 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series and RIDA®CYCLER

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and extension take place in the same step.

Table 6: Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q, and CFX96™

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and extension take place in the same step.

Note: The universal real-time PCR profile can also be used for DNA tests if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR tests are combined in one run.

9.4 Detection channel setting

Table 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Comment
R-Biopharm RIDA®CYCLE R	SARS-CoV-2	Green	-
	ICR	Yellow	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Set the reference dye to none.
	ICR	HEX	
ABI 7500	SARS-CoV-2	FAM	Set the ROX passive reference dye to none.
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor- Gene Q	SARS-CoV-2	Green	The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	Yellow	

10. Quality control

Samples are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR device according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls must show the correct results (see Table 8).

The **Positive Control** comes at a concentration of 10^3 copies/ μ l. It is used in a total quantity of 5×10^3 copies in every PCR run.

Table 8: A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICR Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	Not detectable

*1 A Ct value for the ICR is not needed to obtain a positive result of the positive control.

The positive and negative controls are valid when they meet the conditions specified in the table. The Ct range for the positive control is specified on the Quality Assurance Certificate included with the product. If one of the two controls does not meet the conditions for a valid run, all the reactions need to be re-analyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the devices used
- Correct test procedure

11. Sample interpretation

The results interpretation is done according to table 9.

Table 9: Sample interpretation

Detection of		
SARS-CoV-2	ICR	Result
Positive	Positive/ negative	SARS-CoV-2 detectable
Negative	Positive	Target gene not detectable
Negative	Negative	Invalid

SARS-CoV-2 is detectable if the sample RNA and the **Internal Control RNA** show an amplification signal in the detection system.

SARS-CoV-2 is also detectable if the RNA shows an amplification signal, but no amplification signal can be seen for the Internal Control RNA in the detection system. Detecting the Internal Control RNA is not necessary in this case because high amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

SARS-CoV-2 is not detectable if the RNA shows no amplification signal, but an amplification signal can be seen for the Internal Control RNA in the detection system. Inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is invalid if the sample RNA and the Internal Control RNA do not show an amplification signal in the detection system. There are PCR inhibitors in the sample, or an error occurred during the extraction process. The extracted sample should be diluted 1:10 with PCR water and re-amplified, or the isolation and purification of the sample should be improved.

12. Limitations of the method

7. This test is intended only for human respiratory samples.
8. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false negative results.
9. The presence of PCR inhibitors can lead to non-evaluable results.
10. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false negative results using RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO.
11. As with all PCR-based *in vitro* tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
12. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the target gene (E gene) is present.

13. Performance characteristics










Not applicable

14. Version history

Version number	Section and designation
2020-02-12	Release version

15. Explanation of symbols

General symbols

	For research use only
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Test-specific symbols

Not applicable

16. References

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Accessed on 2020-01-24
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b> Accessed on 2020-02-12
3. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Risikogebiete.html Accessed on 2020-02-03
4. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Accessed on 2020-02-03