



# 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](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

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

# SARS-CoV-2 Mutationen sicher nachweisen mit dem RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO Test

Nachweis der B.1.1.7 (UK) und B.1.351 (ZA) & B.1.128 P.1 (BRA) Varianten



**Spezifisch und sensitiv:** Spezifische Detektion und Differenzierung der SARS-CoV-2 Mutationen B.1.1.7 (UK) und B.1.351 (ZA) & B.1.128 P.1 (BRA)



**Einfach:** Multiplex real-time RT-PCR



**Praktisch:** Positive SARS-CoV-2 Eluate können direkt im Test eingesetzt werden

Mehr Informationen:



[https://r-b.io/de\\_cov](https://r-b.io/de_cov)

# Informationen zum PCR-Test RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO

Art. Nr. PG6830RUO

## Ihre Vorteile



### Flexibel:

Anwendung auf gängigen real-time PCR-Cyclern möglich (z.B. RIDA®CYCLER, LightCycler® 480II, ABI 7500 Fast Dx, CFX96™ Dx oder Rotor-Gene Q)



### Schnell:

Ergebnis innerhalb ca. 1,5 h verfügbar (bei Abarbeitung auf de Roche LC 480 II sogar innerhalb 1 h 10 Min)



### Praktisch:

Optimierter Workflow durch Abarbeitung im RIDA®GENE Universal Profil



### Zuverlässig:

Negativ- und Positivkontrolle im Kit enthalten

## Molekulare Diagnostik von COVID-19

- Die weltweit auftretenden SARS-CoV-2-Mutationen machen den zuverlässigen und schnellen Nachweis von SARS-CoV-2 noch komplexer.<sup>1</sup>
- Diese Varianten unterscheiden sich zum Teil durch eine erhöhte Übertragbarkeit und eine mögliche Reduktion der Wirksamkeit von neutralisierenden Antikörpern.<sup>1</sup> Epidemiologisch ist daher eine Unterscheidung der einzelnen Varianten wichtig.
- Der multiplex real-time RT PCR-Test RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO ermöglicht Ihnen die schnell und zuverlässige Detektion und Differenzierung der aktuell auftretenden SARS-CoV-2 Varianten B.1.1.7 (UK) und B.1.351 (ZA) & B.1.128 P.1 (BRA) aus vorher positiv diagnostizierten SARS-CoV-2 Proben.

RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO, Art. Nr. PG6830RUO

## Bestellinformationen

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Verfahren geeignet.

Produkt	Art. Nr.
RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO	PG6830RUO



<sup>1</sup> [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Virusvariante.html?sessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virusvariante.html?sessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038). Zugriff am 28.01.2021

## RIDA® GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO

**REF** PG6830RUO



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Deutsch .....	3
English.....	15

# RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO

**REF** PG6830

## 1. Zweckbestimmung

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Verfahren geeignet.

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum Nachweis von SARS-CoV-2 Mutationen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Ende Dezember 2019 traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.<sup>1</sup> Anfang Januar 2020 konnte von chinesischen Behörden ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Ursache dieser Erkrankungen identifiziert werden.<sup>1</sup> Die durch SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit erhielt den offiziellen Namen COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) und ist von Mensch zu Mensch übertragbar.<sup>2</sup> Da es sich um einen neuen Erreger handelt kam es rasch von der Entwicklung einer Epidemie zu einer Pandemie.

Weltweit wurden bereits 141.754.944 Fälle gemeldet (Stand: 21.04.2021).<sup>3</sup> Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden. Deutschlandweit wurden bereits 3.188.192 Fälle gemeldet (Stand: 21.04.2021).<sup>4</sup> Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.<sup>1</sup> Seit September 2020 wurde in Großbritannien ein Anstieg der COVID-19-Fälle verzeichnet, was zu verstärkten epidemiologischen und virologischen Untersuchungen führte. Die Analyse der Daten der viralen Genomsequenz ergab, dass ein großer Teil der Fälle zu einem neuen phylogenetischen Cluster gehört. Die neue Variante wird durch mehrere vorhandene Spike-Protein-Mutationen (Deletion 69-70, Deletion 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) sowie Mutationen in anderen genomischen Regionen definiert (ORF1ab, ORF8, N-Gen). Inzwischen gibt es erste Hinweise (begrenzte Datenlage), dass diese neue SARS-CoV-2 Variante B.1.1.7 mit einer erhöhten Fallsterblichkeit einhergeht. Des Weiteren zeigten erste Untersuchungen, dass diese noch leichter von Mensch zu Mensch übertragbar ist als bisher zirkulierende Varianten. Auch in Deutschland sind seit Dezember 2020 Infektionen mit den oben genannten Varianten bekannt geworden. Einige Fälle mit der neuen Variante wurden bisher von Dänemark, den Niederlanden und Belgien gemeldet.<sup>5,6,7</sup>

Eine weitere bisher beschriebene Virusvariante B.1.351 wurde erstmals im Dezember 2020 aus Südafrika gemeldet. Auch bei dieser Variante zeigten erste Testungen eine potenziell höhere Übertragbarkeit. Erste Studien lassen zudem vermuten, dass der Schutz durch neutralisierende Antikörper gegenüber dieser Variante bei Personen, die an der ursprünglichen Variante erkrankt waren oder mit einem auf dieser ursprünglichen Variante beruhenden Impfstoff erhalten haben, reduziert sein könnte.<sup>7</sup>

Die SARS-CoV-2-Variante B.1.1.28 P.1 zirkulierte erstmals im brasilianischen Staat Amazonas. Sie ähnelt in ihren Veränderungen der südafrikanischen Variante. Für diese Variante wird ebenfalls eine erhöhte Übertragbarkeit und eine mögliche Reduktion der Wirksamkeit neutralisierender Antikörper bei Genesenen bzw. Geimpften diskutiert.<sup>7</sup>

### 3. Testprinzip

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO Test ist eine multiplex real-time RT-PCR zum Nachweis von SARS-CoV-2 Mutationen.

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 die Virusvarianten B.1.1.7 (N-Gen D3L, NSP6 106/107/108del), B.1.351 & B.1.1.28 P.1 (NSP6 106/107/108del) und der Referenz (N-Gen, NSP6) (NCBI Datenbank) 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.

#### 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
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 Lineage 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
Roche	MagNa Pure 96
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
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](mailto: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) auf der R-Biopharm Homepage.

## **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.

## 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** und die **No Template Control** auftauen, durchmischen (ausgenommen Enzyme Mix) 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

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
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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.

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

**Positivkontrolle:** 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix 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 ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™ Dx

<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
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	SARS-CoV-2 N-Gene D3L	Green	-
	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	Yellow	
	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	Orange	
	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	SARS-CoV-2 N-Gene D3L	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	533/580	
	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	533/610	
	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	618/660	
<b>ABI 7500 Fast Dx</b>	SARS-CoV-2 N-Gene D3L	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	VIC	
	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	ROX	
	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	SARS-CoV-2 N-Gene D3L	FAM	-
	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	VIC	
	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	ROX	
	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	SARS-CoV-2 N-Gene D3L	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein</b>
	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	Yellow	
	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	Orange	
	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	Red	

## 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/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

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

Probe	Ergebnis	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Nicht nachweisbar

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 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				Ergebnis
SARS-CoV-2 N-Gene D3L	SARS-CoV-2 Referenz E-Gene	SARS-CoV-2 S-Protein L18F/T20N/P26S	SARS-CoV-2 E-Gene P71L	
negativ	<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>SARS-CoV-2 nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>SARS-CoV-2 B.1.1.7 nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>SARS-CoV-2 B.1.1.28 P.1 nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	<b>SARS-CoV-2 B.1.351 nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Zielgen nicht nachweisbar</b>

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt.

## 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 dem RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. Wie bei allen auf PCR basierenden Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.

## 13. Leistungsmerkmale

Nicht zutreffend










## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2021-01-25	Freigabeversion
2021-04-21	Überarbeitung: 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 9.4 Detektionskanaleinstellung 11. Interpretation der Ergebnisse

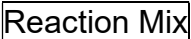


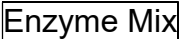
## 15. Symbolerklärung


### Allgemeine Symbole

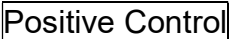
	Für Forschungszwecke
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole









## 16. Literatur

1. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/nCoV.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html). Zugriff am 16.09.2020
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://covid19.who.int/>. Zugriff am 21.04.2021
4. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Fallzahlen.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html). Zugriff am 21.04.2021
5. <https://www.ecdc.europa.eu>. Zugriff 21.12.2020
6. [https://www.cogconsortium.uk/wp-content/uploads/2020/12/Report-1\\_COG-UK\\_19-December-2020\\_SARS-CoV-2-Mutations.pdf](https://www.cogconsortium.uk/wp-content/uploads/2020/12/Report-1_COG-UK_19-December-2020_SARS-CoV-2-Mutations.pdf). Zugriff 21.12.2020
7. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Virusvariante.html?jsessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virusvariante.html?jsessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038). Zugriff am 28.01.2021

**English**

# RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO

**REF** PG6830

## 1. Intended use

For research use only. Not intended for diagnostic procedures.

The RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO test is a multiplex real-time RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2 mutations ((single) nucleotide polymorphisms).

## 2. Summary and explanation of the test

At the end of December 2019 in the Chinese metropolis of Wuhan, numerous cases of pneumonia of unknown cause occurred.<sup>1</sup> At the beginning of January 2020, Chinese authorities identified a novel coronavirus (SARS-CoV-2) as the cause of these illnesses.<sup>1</sup> The disease caused by SARS-CoV-2 was officially named COVID-19 (“coronavirus disease 2019”) and is transmitted from human to human.<sup>2</sup> Due to this pathogen’s novelty, the epidemic rapidly evolved into a pandemic.

There have already been 141,754, 944 cases recorded worldwide (as of April 21, 2021).<sup>3</sup> At the end of January 2020, the first cases were confirmed in Germany as well. Germany has had 3,188,192 cases so far (as of April 21, 2021).<sup>4</sup> The WHO declared a Public Health Emergency of International Concern on 2020-01-31.<sup>1</sup>

There has been an increase in COVID-19 cases in the UK since September, leading to increased epidemiological and virological investigations. Analysis of the viral genome sequences revealed that a large proportion of the cases belonged to a new phylogenetic cluster. The new variant is characterized by several spike protein mutations (deletion 69-70, deletion 144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H) as well as mutations in other genomic regions (ORF1ab, ORF8, N-Gene). There are initial indications (limited data) that this new SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is associated with increased case mortality. Furthermore, initial studies have shown that it is even easier transmissible from person to person than previously circulating variants. Infections with the above-mentioned variants were identified in Germany since December 2020. Some cases with the new variant have been reported in Denmark, the Netherlands and Belgium.<sup>5,6,7</sup>

Another virus variant, B.1.351, was first reported in South Africa in December 2020. Initial tests showed for this variant, too, a potentially higher transmissibility. Initial

studies also suggest that protection by neutralizing antibodies against this variant could be reduced in people who were previously infected with the original variant or who received a vaccine based on the original variant.<sup>7</sup>

The SARS-CoV-2 variant B.1.1.28 P.1 circulated for the first time in the Brazilian state of Amazonas. Its changes are similar to the South African variant. An increased transmissibility and a possible reduction in the effectiveness of neutralizing antibodies in convalescent patients or vaccinated persons are discussed for this variant.<sup>7</sup>

### 3. Test principle

RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO is a multiplex real-time RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2 mutations ((single) nucleotide polymorphisms).

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. Next, real-time PCR is used to amplify the specific gene fragments for the virus variants B.1.1.7 (N gene D3L, NSP6 106/107/108del), B.1.351 & B.1.1.28 P.1 (NSP6 106/107/108del) and the wild-type reference (N gene, NSP6) (NCBI database). The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, **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.

### 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	Reaction Mix	2x	1050 µl	Yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	Red
N	No Template Control	1x	450 µl	White
P	Positive Control	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 to 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 to 8 °C).

## 6. Reagents required but not provided

The RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage 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
Roche	MagNA Pure 96
Real-time PCR devices	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

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

Should you have to use other extraction procedures or real-time PCR devices, please contact R-Biopharm to check the compatibility at [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

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

## 7. Warnings and precautions for the 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 instructions for use when 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 (SDS) on R-Biopharm's website.

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 RNA preparation from human respiratory samples

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

## 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). Prior to use, thaw the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control** and the **No Template Control**, mix thoroughly (except for the enzyme mix), and centrifuge for a short time. Always cool reagents appropriately during the work steps (2 °C to 8 °C).

**Table 3:** Example of the calculation and preparation of the master mix for 10 reactions

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
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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.

**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.

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 RT-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 ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, and CFX96™ Dx

<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
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	SARS-CoV-2 N gene D3L	Green	-
	SARS-CoV-2 reference E gene	Yellow	
	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	Orange	
	SARS-CoV-2 E gene P71L	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	SARS-CoV-2 N gene D3L	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required. Set the ROX passive reference dye to none.</b>
	SARS-CoV-2 reference E gene	533/580	
	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	533/610	
	SARS-CoV-2 E gene P71L	618/660	
<b>ABI 7500 Fast Dx</b>	SARS-CoV-2 N gene D3L	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b> -
	SARS-CoV-2 reference E gene	VIC	
	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	ROX	
	SARS-CoV-2 E gene P71L	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™ Dx</b>	SARS-CoV-2 N gene D3L	FAM	<b>The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.</b> -
	SARS-CoV-2 reference E gene	VIC	
	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	ROX	
	SARS-CoV-2 E gene P71L	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	SARS-CoV-2 N gene D3L	Green	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.</b>
	SARS-CoV-2 reference E gene	Yellow	
	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	Orange	
	SARS-CoV-2 E gene P71L	Red	



## 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 is present in a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu$ l. It is used in a total quantity of  $5 \times 10^3$  copies in every PCR run.

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

Sample	Result	Target gene Ct
Positive control	Positive	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Not detectable

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 items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

## 11. Result interpretation

The results interpretation is done according to Table 9.

**Table 9:** Sample interpretation

Detection of				Result
SARS-CoV-2 N gene D3L	SARS-CoV-2 reference E gene	SARS-CoV-2 S protein L18F/T20N/P26S	SARS-CoV-2 E gene P71L	
negative	positive	negative	negative	<b>SARS-CoV-2 detectable</b>
positive	positive	negative	negative	<b>SARS-CoV-2 B.1.1.7 detectable</b>
negative	positive	positive	negative	<b>SARS-CoV-2 B.1.1.28 P.1 detectable</b>
negative	positive	negative	positive	<b>SARS-CoV-2 B.1.351 detectable</b>
negative	negative	negative	negative	<b>Target gene not detectable</b>

A sample is positive if the sample RNA shows an amplification signal in the detection system.

A sample is negative if the sample RNA does not show an amplification signal.

## 12. Limitations of the method

1. This test is intended only for human respiratory samples.
2. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false negative results.
3. The presence of PCR inhibitors can lead to non-evaluable results.
4. 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 the RIDA®GENE SARS-CoV-2 Lineage RUO test.
5. As with all PCR-based tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.

## 13. Performance characteristics










Not applicable

## 14. Version history

Version number	Section and designation
2021-01-25	Release version
2021-04-21	Revision: 2. Summary and explanation of the test 9.4 Detection channel setting 11. Result interpretation

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

	For research use only
	Consult instructions for use
	Batch number
	Use before
	Store at
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

### Test-specific symbols

Reaction Mix

Enzyme Mix

No Template Control

Positive Control

## 16. References

1. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/nCoV.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html).  
Last accessed: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Last accessed: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Last accessed: 28.01.2021
4. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Fallzahlen.html](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html).  
Last accessed: 28.01.2021
5. <https://www.ecdc.europa.eu>. Last accessed: 21.12.2020
6. [https://www.cogconsortium.uk/wp-content/uploads/2020/12/Report-1\\_COG-UK\\_19-December-2020\\_SARS-CoV-2-Mutations.pdf](https://www.cogconsortium.uk/wp-content/uploads/2020/12/Report-1_COG-UK_19-December-2020_SARS-CoV-2-Mutations.pdf). Last accessed: 21.12.2020
7. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Virusvariante.html?;jsessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virusvariante.html?;jsessionid=3DB10A96DE726B7AE1866B05B394309B.internet061?nn=2444038).  
Last accessed: 28.01.2021