

# DIAGNOVITAL

## **SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit**

Qualitativer RT-PCR-basierter Erkennung der SARS-CoV-2 K417N-Mutation

*Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.*

**RUO**

**REF**



090R07025 25 Tests

090R07050 50 Tests

090R07100 100 Tests

## **Inhaltsverzeichnis**

Verwendungszweck .....	3
Produktbeschreibung .....	3
Mitgelieferte Materialien .....	4
Zusätzliche Materialien Erforderlich .....	4
Lagerung .....	5
Leistungsmerkmale .....	6
Überlegungen vor dem Start .....	7
Probenvorbereitung .....	7
Reaktions-Setup .....	8
Analyse & Fehlerbehebung .....	10
Einschränkungen .....	13
Warenzeichen .....	13
Symbole .....	14

## Verwendungszweck

**DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basierter Test zur Erkennung und zur Unterscheidung von SARS-CoV-2 K417N-Mutationen in Atemwegsproben. **Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

**DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** weist die K417N-Mutation in extrahierter SARS-CoV-2-RNA aus Nasopharyngeal- und Oropharynx-Abstrichproben während einer Infektion nach. Positive Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA eine einzelne Punktmutation nachweisen kann, die zum Austausch der Aminosäure Lysin gegen Asparagin im Spike-Protein an Position 417 führt. Mutationen an Position 417 werden in zwei Variantenlinien gefunden, jedoch ist der Austausch zu einem Asparagin spezifisch für die südafrikanische Abstammungslinie B.1.351 und kann zur genauen Unterscheidung der verschiedenen Variantentypen von SARS-CoV-2 beitragen. Der K417N ist eine Mutation, die in verschiedenen Abstammungslinien vorkommt und bereits in der südafrikanischen (B.1.351) und brasilianischen (B.1.1.28) Abstammungslinie gefunden wurde. Die begleitenden K417N- und E484K-Mutationen im südafrikanischen Stamm bilden ein Gegengewicht zur erhöhten Affinität des Spikes aufgrund der N501Y-Mutation. Sie verhindern die Bildung von zwei Salzbrücken, die zur Bildung und Stabilisierung des RBD-ACE2-Komplexes beitragen. Dies verringert die ACE2-Bindungsaffinität. Somit ist dieser Stamm weniger infektiös und verbreitet sich weniger schnell als der UK-Stamm. Dies, obwohl beide die letztgenannte Substitution teilen. Die Mutation befindet sich im Spike-Protein und scheint einen Einfluss auf die Immunantwort des Körpers und möglicherweise auf die Wirksamkeit des Impfstoffs zu haben. Es wird berichtet, dass monoklonale und aus Serum stammende Antikörper 10- bis 60-mal weniger wirksam bei der Neutralisierung von Viren sind, die die K417N-Mutation tragen.

## Produktbeschreibung

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basiertes Erkennungs- und Unterscheidungssystem für die SARS-CoV-2 K417N Mutation. **Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

**DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** weist zusätzlich zu den Wildtyp- (K417) und den mutierten (N417) Sequenzen auch das Vorhandensein eines sequenzspezifischen humanen Ziels (RNaseP) nach, das als humane Extraktionskontrolle (HEC) in verschiedenen Kanälen dient.

## ECHTZEIT-PCR-BASIERTE ERKENNUNG VON SARS-CoV-2

Der erste Schritt beim Erkennen der SARS-CoV-2 K417N-Mutation ist die Umwandlung von viraler RNA in cDNA. Anschließend werden die viralen Zielsequenzen und die RNaseP (HEC) gleichzeitig in einer Reaktion verstärkt, wobei die Verstärkung durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden in Echtzeit überwacht wird: Beim Einbau in die neu verstärkten DNA-Stränge wird das Fluorophor freigesetzt und die Fluoreszenz erhöht. Signal kann beobachtet werden.

Mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** wird die Unterscheidung zwischen den viralen Zielen durch die Verwendung von zwei verschiedenen Fluorophoren erreicht, die in zwei verschiedenen Kanälen nachgewiesen werden: FAM™ für Wildtyp SARS-CoV-2 K417, HEX/VIC für die N417-Mutation und die RNaseP (HEC) werden im Cy5-Kanal erkannt.

Aufgrund der intrinsischen Mutationsrate von Viren ist es möglich, dass Mutationen in der Zielsequenz auftreten und sich im Laufe der Zeit anhäufen. Dies kann bei einem PCR-basierten Nachweisansatz zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** ist mit Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx validiert und kompatibel mit BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems-kalibrierter FAM™, HEX/VIC und Cy5-Kanälen



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0

RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -



## Mitgelieferte Materialien

	Reagenzien	Menge und Volumen (25 Tests)	Menge und Volumen (50 Tests)	Menge und Volumen (100 Tests)
1	PCR-Mastermix	1 × 375 µl	1 × 750 µl	1 × 1500 µl
2	Positivkontrolle	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl
3	Nukleasefreies dH <sub>2</sub> O	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl



**WICHTIG!** Die obige Tabelle gibt das Standard-Farbschema des Kits wieder. Aufgrund von Lieferantenproblemen während der COVID-19-Krise können einzelne Farben der Röhrenkappen je nach Verfügbarkeit ersetzt werden. Überprüfen Sie vor der Verwendung immer die Kennzeichnung des Reagenzes.

## Zusätzliche Materialien Erforderlich

- Geeignete Mittel & Ausrüstung zur Nukleinsäureextraktion
- Echtzeit-PCR-Detektionssystem ausgestattet für FAM™-, HEX/VIC- und Cy5-Erkennung
- Verstellbare Pipetten & passende gefilterte Pipettenspitzen
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung und Arbeitsbereiche für die Arbeit mit potenziell infektiösen Proben
- Oberflächendekontaminanten wie DNAzap™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNase Away™ (Fisher Scientific), 10 % Bleichmittel (1:10 Verdünnung von handelsüblichem 5,25-6,0 % Natriumhypochlorit)
- Nukleasefreie Röhren / Streifen / Platten zur Herstellung von Verdünnungen, Mastermixen etc.
- Real-Time PCR-Reaktionsröhrchen/-platten/-kapillaren

Für **BIO-RAD CFX96**: Hard-Shell Dünnwandige Umrandete 96-Well-PCR-Platten mit Barcodes (BIO-RAD, Kat.-Nr.: HSP-9955), Hard-Shell Dünnwandige Umrandete 96-Well-PCR-Platten (BIO-RAD, Kat.-Nr.: HSP-9655), Microseal 'B' Klebedichtungen, optisch klar (BIO-RAD, Kat.-Nr.: MSB-1001), Einzelne PCR-Röhrchen, Low Tube Streifen, 8-Röhrchen-Streifen, 0,2 ml Low Profile, Weiß (BIO-RAD, Kat.-Nr.: TLS0851), Flat Cap Strips, optisch Klar, 8-Kappen-Streifen, 0,2 ml (BIO-RAD, Kat.-Nr.: TCS0803).

Für **Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx- Quant Studio 5 Real-Time PCR System**, MicroAmp® Optische 96-Well-Reaktionsplatte (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4306737), MicroAmp® Optischer Klebefilm (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4311971), MicroAmp® Optischer 8-Röhrchen-Streifen, 0,2 mL (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4316567), MicroAmp® Optische 8-Kappen-Streifen (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 4323032)

- Geeignete Aufbewahrungsmöglichkeiten für Reagenzien und Proben (4°C, -20°C, -70°C)



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rtal@rtal-abs.com.tr](mailto:rtal@rtal-abs.com.tr)  
Web: [www.rtal-abs.com.tr](http://www.rtal-abs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0

RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -



## Lagerung

- Lagern Sie alle Komponenten bei -15°C /-25°C und vermeiden Sie mehr als 3 Gefrier- und Auftauzyklen.
- Schützen Sie den qPCR-Mastermix vor Licht, da eine längere Exposition die Leistung der Fluorophore beeinträchtigen kann.
- Wenn die Komponenten des Kits während des Transports beschädigt wurden, wenden Sie sich an RTA Laboratories. Nicht verwenden, da die Leistung beeinträchtigt werden kann.
- Halten Sie die Reagenzien vom Probenmaterial getrennt, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Nicht nach dem angegebenen Verfallsdatum verwenden.



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)

RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

# Leistungsmerkmale

## Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze für Nukleinsäure-basierte Assays wird durch den 95 % positiven Cutoff-Wert ausgedrückt. Dies ist die Analytkonzentration, bei der 95 % der Testläufe nach seriellen Verdünnungen mit einem Referenzmaterial positive Ergebnisse liefern. In dieser Studie wurde die analytische Sensitivität durch Verwendung einer Verdünnungsreihe von VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL (21MBC137002-R) für den Wildtypkanal und VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 (21MBC139001-R) analysiert

RNA-KONTROLLE für mutierten Kanal. Verdünnungen wurden durch eine negative klinische RNA-Probe hergestellt. Jede Verdünnung wurde mit 23 Wiederholungen getestet. QuantStudio 5-DX Real-time PCR Systems wurde für die Verstärkung, Signaldetektion und Analyse der Ergebnisse verwendet. Die Probit-Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics 27 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten gezeigt.

**Tabelle 1:** DIAGNOVITAL K417N Mutation Detection - Erkennungsgrenze (LoD)-Werte und 95 % Konfidenzbereiche

Zielgen	Erkennungsgrenze (Kopien/ml)	95 % Konfidenz untere Grenze	95 % Konfidenz obere Grenze
K417	7947.595	5653.225	18316.030
N417	7168.476	4676.692	36608.421

## Diagnostische Spezifität

Insgesamt 192 klinische Proben, die von Patienten mit Covid-Symptomen gesammelt wurden, wurden mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** analysiert und die Ergebnisse mit der Sequenz-Analyse der nächsten Generation verglichen. 186 von ihnen waren negativ für die K417N-Mutation und 6 von ihnen wurden mit beiden Methoden als positiv befunden. Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) des DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit in Bezug auf NGS beträgt 100 % und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) beträgt 100 %. Alle internen Kontrollen (RNaseP) wurden positiv getestet.

**Table 2.** DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit –NGS qPCR Korrelationsstudie

NP-Tupfer		Komparator (NGS und qPCR)	
		Mutant	Wildtyp
DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit	N417	6	0
	K417	0	186
	Nicht definiert	0	0
	Ge s a mt	6	186



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

# Überlegungen vor dem Start

## BIO-SICHERHEIT

- Tragen Sie bei der Arbeit mit klinischen Proben geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Kittel, puderfreie Handschuhe, Augenschutz).
- Die Probenverarbeitung sollte in einer zertifizierten biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II nach den Richtlinien der biologischen Sicherheitsstufe 2 oder höher erfolgen.
- Weitere Informationen finden Sie unter:
  - Vorläufige Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Prüfung klinischer Proben von untersuchten Patienten (PIs) für das neuartige Coronavirus 2019 (SARS-COV-2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
  - Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 6. Ausgabe verfügbar unter <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- Die Verwendung des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** und die Datenauswertung sind ausschließlich geschultem Laborpersonal vorbehalten.
- Eine gute Laborpraxis ist für die optimale Leistung dieses Assays unerlässlich. Besondere Vorsicht ist geboten, um eine Kontamination der Komponenten des Kits zu vermeiden. Alle Reagenzien müssen engmaschig auf Verunreinigungen und Kontamination überwacht werden. Entsorgen Sie verdächtige Reagenzien gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften

## PROBEN

Verwenden Sie zum Testen nur geeignete Proben, wie zum Beispiel:

- Atemwegsproben einschließlich Nasopharyngeal/Oropharyngeal.
- Abstrichproben sollten nur auf Tupfern mit einer synthetischen Spitze (wie Polyester oder Dacron®) mit Kunststoffschachtel entnommen werden. Tupfer mit Calciumalginat oder Wattestäbchen mit Holzschachtel sind nicht akzeptabel.

## PROBEN - HANDHABUNG UND LAGERUNG

- Die Proben können nach der Entnahme bis zu 72 Stunden bei 2-8°C gelagert werden.
- Wenn eine Verzögerung der Extraktion erwartet wird, lagern Sie Proben bei -20°C oder niedriger.
- Extrahierte Nukleinsäuren sollten bei -20°C oder niedriger gelagert werden.

Verwenden Sie keine Proben, wenn

- sie wurden nicht bei 2-8°C ( $\leq 4$  Tage) aufbewahrt oder bei -20°C oder darunter eingefroren.
- sie sind unzureichend gekennzeichnet oder weisen keine Dokumentation auf.
- sie sind hierfür nicht geeignet (geeignetes Probenmaterial siehe oben).
- das Probenvolumen ist nicht ausreichend.

## Probenvorbereitung

- Die Leistung von RT-PCR-Assays hängt stark von der Menge und Qualität der Proben-Templat-RNA ab. Es wird dringend empfohlen, RNA-Extraktionsverfahren für die Gewinnung und Reinheit zu qualifizieren und zu validieren, bevor Proben getestet werden.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rtal@rtal-abs.com.tr](mailto:rtal@rtal-abs.com.tr)

Web: [www.rtal-abs.com.tr](http://www.rtal-abs.com.tr)

RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0

RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -



- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** wird mit dem RTA Viral RNA Isolation Kit validiert.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** ist kompatibel mit dem Tianlong Generotex96 Extraction System und dem QIAamp® MinElute Virus Spin Kit, VERSANT® Sample Preparation 1.0 Reagents.
- Validierte Real-Time PCR-Systeme : Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx.
- Kompatible Real-Time PCR-Systeme : BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems.
- Lagern und bewahren Sie Restproben und extrahierte Nukleinsäuren bei -20°C oder -80°C auf.
- Tauen Sie nur die Anzahl der Probenextrakte auf, die an einem einzigen Tag getestet werden.
- Extrakt vor dem Test nicht mehr als einmal einfrieren/auftauen, da jedes Einfrieren/Auftauen die RNA-Qualität verringert.
- Je nach Probentyp kann es möglich sein, Patientenproben direkt zu verwenden. Dies kann jedoch einen vorherigen Lyseschritt und eine Titration der Probenmenge erfordern, die ohne Hemmung der Reaktion verwendet werden kann. Dieses Verfahren wurde nicht validiert, die Verwendung von isolierter RNA wird empfohlen.

## Reaktions-Setup

1. Stellen Sie sicher, dass alle notwendigen Ausrüstung und Geräte geeignet, kalibriert und funktionsfähig sind, bevor Sie mit den Experimenten beginnen.
2. Dekontaminieren Sie Ausrüstung und Arbeitsbereich und bereiten Sie alles vor, was für das folgende Experiment benötigt wird, um den Arbeitsablauf kurz und wiederholbar zu halten.
3. Schalten Sie das PCR-Detektionssystem ein und programmieren Sie es, um Verzögerungen nach dem Einrichten der Reaktionen zu vermeiden.
4. Tauen Sie alle Komponenten des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** auf Eis auf und mischen Sie sie vorsichtig, aber gründlich, um eine gleichmäßige Verteilung der Komponenten zu gewährleisten. Sammeln Sie Flüssigkeit am Boden des Röhrchens mit einer schnellen Drehung (über Mikrozentrifuge).
5. Der mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** gelieferte **PCR Master Mix** ist gebrauchsfertig. Für jede Probe wird eine Reaktion vorbereitet. Für Negativkontrolle (NTC) und Positivkontrolle (TPC) sollte eine separate Reaktion vorbereitet werden.

Komponente	Volumen (µl)
PCR-Mastermix	15
RNA-Isolat/ TPC/ NTC	5
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>

6. Verteilen Sie **15 µl** PCR Master Mix auf Ihre Streifen/Platte und fügen Sie **5 µl Ihrer Proben hinzu**. (Ein Beispiel-Setup finden Sie in **Abb. 1**).



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
 Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
**Fax:** +90 262 751 0677 **E-mail:** [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
**Web:** [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
 RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0




RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	TPC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S89
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S90
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S91
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S92
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S93
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S94
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NTC

**Abbildung 1: Beispiel-Pipettierschema für die Verteilung von Mastermixen mit den einzelnen Assay-Mixes**

7. Übertragen Sie die Reaktionen auf das PCR-Gerät und gehen Sie dann gemäß diesen Richtlinien vor:

Schritt	Kreisläufe	Temperatur	Dauer
Reverse Transkription	1	50°C	10 Minuten
Anfängliche Denaturierung	1	95°C	5 Minuten
Verstärkung	40	95°C	5 Sekunden
		57°C* 	30 Sekunden

\*Aktivieren Sie die Datenerfassung für **FAM™** (Wildtyp K417 SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (N417 SARS-CoV-2 Mutation) und **Cy5** (HEC).

8. Öffnen Sie nach Abschluss des Laufs die Reaktionsgefäße nicht, um eine Kontamination zu vermeiden, und entsorgen Sie sie gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften. Nicht autoklavieren, da dadurch Laborgeräte mit Amplikons kontaminiert werden können.

# Analyse & Fehlerbehebung

## BEISPIELHAFTE ERGEBNISSE

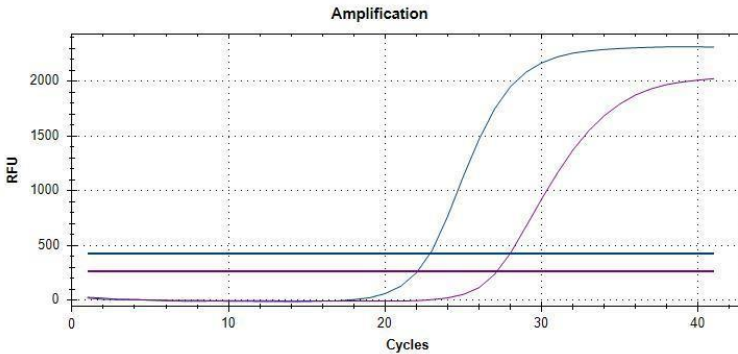


Abbildung 2: *Blau Kurven:* K417 Wildtyp-Probe am FAM-Kanal, *Purple Curves:* interne Kontrolle am Cy5-Kanal.

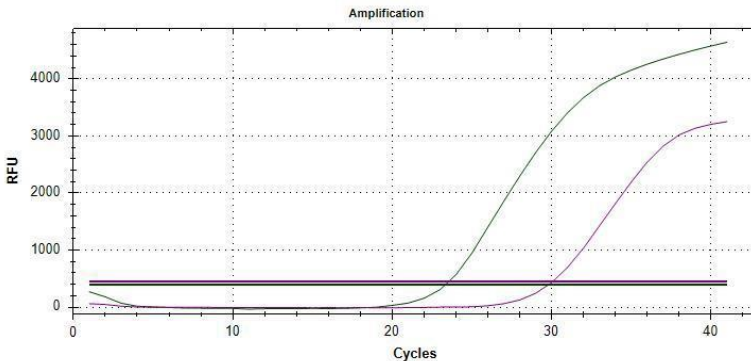


Abbildung 3: *Grüne Kurven:* N417 Mutante positive Probe am HEX-Kanal, *Purple Curves:* interne Kontrolle am Cy5-Kanal.

- **dH<sub>2</sub>O-Kontrollen (NTC) dürfen bei keinem Assay einen positiven Ct-Wert ergeben.** Wenn dies der Fall ist, war die Reaktion mit Proben-RNA/DNA verunreinigt. Dekontaminieren Sie Geräte und Arbeitsbereich und wiederholen Sie die Reaktionen.
- **Alle Reaktionen, die RNA-Isolat enthalten, müssen positive Ct-Werte für den internen Kontrollassay ergeben. Die Ct-Werte sollten < 38 Zyklen betragen.** Wenn die interne Kontrolle nicht verstärkt wird, weist dies auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion oder einen Verlust des RNA-Isolats aufgrund einer RNase-Kontamination hin. Die Probe ist nicht ausreichend, Ergebnisse können nicht interpretiert werden.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkiye **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0

RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -



- **Damit eine Probe als negativ für die K417N-Mutation angesehen wird, muss der FAM™-Kanal einen positiven Ct-Wert aufweisen.** Eine Verstärkung der HEC im Cy5-Kanal wird um Ct 20-38 erwartet.
- **Damit eine Probe als positiv für die mutierte K417N-Mutation angesehen wird, muss der HEX/VIC-Kanal einen positiven Ct-Wert aufweisen.** Sollte sich der HE C nicht verstärken, muss die Probe dennoch als positiv betrachtet werden. Dieses Ergebnis ist möglich, wenn einen ungewöhnlich hohen Virustiter aufweisen oder die Probe nicht menschlichen Ursprungs war, sondern aus einer Zellkultur gewonnen wurde oder eine Analyse von Oberflächenkontakt.
- **Bei der Positivkontrolle muss ein positiver Ct an den FAM- und HEX/VIC-Kanälen beobachtet werden. Der Ct-Wert für die Positivkontrolle sollte 20±3 sein.** Entspricht der Ct-Wert nicht dem erwarteten Wert oder wurde die **Positivkontrolle** nicht positiv getestet, war die PCR kompromittiert. Überprüfen Sie das Reaktionssetup und die PCR-Geräteeinstellungen und wiederholen Sie die Reaktionen. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen der **Positivkontrolle** können deren Qualität beeinträchtigen, was zu späten Ct-Werten führt.
- Wenn Ct für jeden der FAM-, HEX/VIC- und CY5-Kanäle <38 ist, sollte das Ergebnis im jeweiligen Kanal als **POSITIV** betrachtet werden, wenn Ct > 38 ist oder kein Wert empfangen wird, sollte das Ergebnis im entsprechenden Kanal berücksichtigt werden als **NEGATIV**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Ergebnis
-	-	+	Die Probe ist negativ für SARS-CoV-2. <b>Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.</b> - Stellen Sie sicher, dass die Probe SARS-CoV-2-positiv ist. - Variationen in den Sondenbindungsregionen - Sequenz-Analyse mit einer anderen Methode wird empfohlen.
+	-	+	Die Probe ist <b>negativ</b> für die K417N-Mutation.
-	+	+	Die Probe ist <b>positiv</b> für die K417N-Mutation.
-	-	-	Keine Verstärkung in irgendeinem Kanal weist auf fehlerhafte RNA-Isolierung, Probenabbau oder PCR-Hemmung hin. Ergebnisse können nicht interpretiert werden. -RNA kann während des Transports, der Extraktion oder Lagerung abgebaut werden.
+	+	-	Erwartetes Ergebnis für die <b>Positivkontrolle (TPC)</b> .
-	-	-	Erwartetes Ergebnis für die <b>Negativkontrolle (NTC)</b> .

## Geräteeinstellung

Für **QUANTSTUDIO5DX**, erstellen oder öffnen Sie auf dem Startbildschirm eine Vorlage. Klicken Sie im Bereich Neues Experiment auf die Schaltfläche Neues Experiment erstellen, um eine neue Vorlage zu erstellen. Geben Sie auf der Registerkarte Eigenschaften die Vorlageninformationen ein. Passen Sie auf der Registerkarte Methode das Reaktionsvolumen an und richten Sie ein geeignetes thermisches Profil ein. Weisen Sie auf der Registerkarte Platte (Schnelleinrichtung) Plattenattribute zu, indem Sie die Passive Referenz aus der Dropdown-Liste auswählen. Definieren und weisen Sie auf der Registerkarte Platte (Schnelleinrichtung) Well-Attribute zu und wählen Sie Wells im Platten-Layout oder der Well-Tabelle aus. Weisen Sie dann den ausgewählten Wells Proben und Ziele zu.



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

Hinweis: Neue Proben- oder Zielnamen, die in der Unterregister Quick Setup eingegeben werden, werden automatisch mit Standardwerten für Reporter als FAM, für Quencher als NFQ-MGB und für Task als Unbekannt gefüllt. Bearbeiten Sie diese Werte im Unterregister Advanced Setup. Für TaqMan-Sonden muss die Option NFQ-MGB als Quencher verwendet werden. Starten Sie dann den Lauf.

Öffnen Sie für **BIORAD CFX 96** in der Software-Anwendung das Protokoll über den Menüpunkt Datei. Erstellen Sie das entsprechende Protokoll für das zu verwendende Kit. Definieren und weisen Sie auf der Registerkarte Platte Well-Attribute zu und wählen Sie Wells im Platten-Layout oder der Well-Tabelle aus. Weisen Sie dann den ausgewählten Wells Proben und Ziele zu. Starten Sie dann den Lauf.

## Baseline- und Schwellenwertereinstellungen

Nach dem Lauf,

Für **QUANTSTUDIO5DX**, klicken Sie auf die Schaltfläche Diagrammeinstellungen anzeigen, um den Diagrammtyp von der logarithmischen Skala in die lineare Skala zu ändern. Das Ziel kann im Abschnitt Ziel geändert werden. Klicken Sie dann auf die Schaltfläche Analyseeinstellung, um den Basislinien-Schwellenwert anzupassen. Deaktivieren Sie den automatischen Schwellenwert und deaktivieren Sie die automatische Baseline. Setzen Sie den Basislinien-Startzyklus auf 7-8 und den Basislinien-Endzyklus auf 20, um die Grafik zu normalisieren.

Für **BIORAD CFX 96** kann der Schwellenwert entsprechend dem Verhältnis von FAM zu HEX-Signalhöhe eingestellt werden.

Die Basislinie der Verstärkungskurve ist einer der Parameter, die die PCR-Ergebnisse beeinflussen können. Falls die Basislinie falsch eingestellt ist, kann ein Ct-Wert angezeigt werden, auch wenn keine echte Verstärkung aufgetreten ist. Auto Threshold wird mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K417N Mutationsnachweis-Kit** für PCR-Detektionssysteme verwendet. Wenn der Anstieg einer Probe in einem Kanal **weniger als 10 %** des Anstiegs, der am stärksten ansteigenden Probe im selben Kanal beträgt, wird dieser Anstieg als **NEGATIV betrachtet**. In einigen Fällen sollte der Schwellenwert manuell eingestellt werden, um Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden. Für jede Probe sollte das Verhältnis von FAM zu HEX-Signalhöhe überprüft werden; das Signal, das das andere um das 3-fache oder mehr überwiegt, sollte als positiv angesehen werden, da sich nur eines von ihnen verstärken sollte.

## Fehlerbehebung

PROBLEM	MÖGLICHE GRÜNDE	LÖSUNG
Negatives Ergebnis für interne Kontrolle	Der PCR Master Mix war möglicherweise nicht homogen.	Das Pipettieren sollte für den PCR Master Mix durchgeführt werden.
	Die RNA-Isolierung kann möglicherweise nicht richtig durchgeführt werden.	Die Studie sollte aus der Isolation wiederholt werden.
	Das Isolat kann einen Inhibitor enthalten.	Die Real-Time-PCR-Phase sollte wiederholt werden, indem das Isolat 1/10 verdünnt wird.
Positives Ergebnis für NTC	Möglicherweise ist eine Kontamination aufgetreten.	Möglicherweise ist eine Kontamination aufgetreten vom Arbeitsbereich zu den Verbrauchsmaterialien, an denen gearbeitet wird. Es wird empfohlen, Verbrauchsmaterialien zu entsorgen und neue zu öffnen und die Umgebung zuerst mit 10 % NaClO-Lösung und dann mit 70 % Alkohol zu reinigen.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
 Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
 Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rtal@rtalabs.com.tr](mailto:rtal@rtalabs.com.tr)  
 Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
 RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

## Einschränkungen

- Dieses Kit wurde entwickelt, um nur Proben zu testen, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, müssen die Richtlinien in diesem Handbuch unbedingt eingehalten werden. Änderungen des Reaktionsaufbaus oder des Kreislaufprotokolls können zu fehlgeschlagenen Experimenten führen.
- Abhängig von der Probenmatrix können Inhibitoren in der isolierten RNA vorhanden sein und die reverse Transkription und/oder PCR-Verstärkung deaktivieren. In diesem Fall kann ein anderer Probentyp oder eine andere Isolierungsmethode von Vorteil sein.
- Spontane Mutationen innerhalb der Zielsequenz können dazu führen, dass die Zielsequenz nicht erkannt wird.
- Ergebnisse müssen immer unter Berücksichtigung aller anderen Daten aus einer Probe interpretiert werden. Die Interpretation muss von Personal durchgeführt werden, das mit dieser Art von Experimenten geschult und erfahren ist.

## Warenzeichen

NucliSens<sup>®</sup> (bioMérieux), QIAamp<sup>®</sup>, RNeasy<sup>®</sup> (QIAGEN), ChargeSwitch<sup>®</sup> (Invitrogen), FAM<sup>™</sup> (Life Technologies), DNAZap<sup>™</sup>, DNA Away<sup>™</sup>, RNase Away<sup>™</sup>

Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten nicht als rechtlich ungeschützt



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)










Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)


RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

## Symbole

	Verfallsdatum
	Chargen
	Katalognummer
	Temperaturbegrenzung
	Vorsicht
	Hersteller
	Konsultieren Sie die Gebrauchsanweisung oder konsultieren Sie die elektronische Gebrauchsanweisung
	Enthält ausreichend für (n) Mengentests
	Nur für Forschungszwecke

 **RTA LABORATUVARLARI**  
**BİYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ**  
**VE MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.**  
GEPOSB Cumhuriyet Cad. Nr:3  
41400 Gebze / Kocaeli / Türkiye

Tel: +90 262 648 5300  
E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)

 **RTA Laboratuvarları**

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)  
Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0

RTA.KK.707 Revisionsdatum/Revisionsnr.: - / -

