

# DIAGNOVITAL

## SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit

Qualitativer RT-PCR-basierter Nachweis der SARS-CoV-2  
T478K-Mutation

*Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.*

**RUO**

**REF**



090R16025 25 Tests

090R16050 50 Tests

090R16100 100 Tests

## Inhaltsverzeichnis

Vorgesehene Verwendung .....	3
Produktbeschreibung .....	3
Bereitgestellte Materialien .....	4
Zusätzlich benötigte Materialien .....	4
Lagerung .....	4
Leistungsmerkmale.....	4
Überlegungen vor dem Start .....	5
Probenvorbereitung .....	6
Reaktions-Setup.....	7
Analyse & Fehlerbehebung.....	9
Einschränkungen .....	12
Markenzeichen .....	12
Symbole.....	13



RTA Laboratuvarları

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## Verwendungszweck

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutation Detection Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basierter Test zur Erkennung und zur Unterscheidung von SARS-CoV-2 T478K-Mutationen in Atemwegsproben. Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.

**DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K478K Mutationsnachweis-Kit** erkennt P681R-Mutation in extrahierter SARS-CoV-2-RNA aus nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichproben während der Infektion. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin und ermöglicht die T478K im Spike-Protein. Das Spike-Protein des Wildtyps SARS-CoV-2 hat die Aminosäure Positiv geladenes Lysin an Position 478, während die Variante von SARS-CoV-2 die Aminosäure Threonin an Position 478 hat.

B.1.617-Linie T478K wird wie folgt bezeichnet: Im Januar 2021 wurde die Spike-Protein-Aminosäure 478 von SARS-CoV-2 in Nordamerika sequentiell angebaut. Der Austausch von Threonin ist auf die Aminosäure zurückzuführen, die nicht mit positiv geladenem Lysin geladen ist. Diese Mutation tritt an der Stelle der Interaktion mit dem menschlichen Rezeptor ACE2 auf. Infolgedessen kann die Wechselwirkung von ACE2 mit Medikamenten oder Antikörpern verstärkt werden, wenn sie mit anderen Spike-Mutationen kombiniert wird, die gleichzeitig auftreten. T478K beeinträchtigt die Bindungsdomäne des menschlichen Rezeptors ACE2 an das Spike-Protein und erhöht das elektrostatische Potenzial an seiner Schnittstelle. Die T478K-Position im Interaktionskomplex mit menschlichem ACE2 kann seine Affinität für menschliche Zellen beeinflussen. Folglich kann es sich auf die virale Infektiosität auswirken. Aufgrund von Aminosäureänderungen, die in diesen Intervallen auftreten, interagiert es stärker oder weniger stark mit Rezeptoren, Medikamenten und Antikörpern. Derzeit gibt es keine klinischen Hinweise darauf, dass die T478K-Mutation die Ansteckungskraft erhöht.

## Produktbeschreibung

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** ist ein Echtzeit-RT-PCR-basiertes Erkennungs- und Differenzierungssystem für die SARS-CoV-2 P681R Mutation. **Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben.**

Das **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** erkennt auch das Präsenz eines sequenzspezifischen humanen Ziels (RNaseP), die als humane Extraktionskontrolle (HEC) zusätzlich zu den Wildtyp- (T478) und den Mutante (K478)-Sequenzen in verschiedenen Kanälen dienen.

### REAL-TIME-PCR-BASIERTER NACHWEIS VON SARS-CoV-2

Der erste Schritt beim Nachweis der SARS-CoV-2 P681R-Mutation ist die Wandlung von viraler RNA in cDNA. Anschließend werden die viralen Zielsequenzen und die RNaseP (HEC) gleichzeitig in einer Reaktion amplifiziert, wobei die Amplifikation durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden in Echtzeit überwacht wird: beim Einbau in die neu amplifizierten DNA-Stränge wird das Fluorophor freigesetzt und ein Anstieg des Fluoreszenzsignals kann beobachtet werden.

Mit **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 K478K Mutationsnachweis-Kit** wird die Differenzierung zwischen den viralen Targets durch die Verwendung von zwei verschiedenen Fluorophoren erreicht, die in drei verschiedenen Kanälen nachgewiesen sind: FAM™ für Wildtyp SARS-CoV-2 T478, HEX/VIC für die K478-Mutation und die RNaseP (HEC) sind im Cy5-Kanal nachgewiesen.

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.

**DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K 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. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta.labs.com.tr](mailto:rta@rta.labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta.labs.com.tr](http://www.rta.labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## Bereitgestellte Materialien

Tabelle 1: DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit – Inhalt

	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 die Farben der Röhrchenkappen je nach Verfügbarkeit ersetzt werden. Überprüfen Sie vor der Verwendung immer die Kennzeichnung des Reagenzes.

## Zusätzliche Materialien erforderlich

- Geeignete Mittel und Equipment für die Nukleinsäureextraktion
- Real-Time-PCR-Detektionssystem ausgestattet für FAM™, HEX/VIC und Cy5-Detektion
- Verstellbare Pipetten und passende gefilterte Pipettenspitzen
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung und Arbeitsräume für die Arbeit mit potentiell infektiöse 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 Röhrchen / Streifen / Platten zur Herstellung von Verdünnungen, Mastermischen usw.
- Real-Time PCR-Reaktionsröhrchen/-platten/-kapillaren

Für **BIO-RAD CFX96**: Hard-Shell Dünwandige Umrandete 96-Well-PCR-Platten mit Barcodes (BIO-RAD, Kat.-Nr.: HSP-9955), Hard-Shell Dünwandige 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- Applied Biosystems 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)

## Lagerung

- Lagern Sie alle Komponenten bei -15°C /-25°C und vermeiden Sie mehr als 3 Einfrier- und Auftauzyklen.
- Schützen Sie den qPCR-Mastermix vor Licht, da eine längere Belichtung die Leistung der Fluorophore beeinträchtigen kann.
- Wenn die Komponenten des Kits während des Transports beschädigt wurden, wenden Sie sich an RTA Laboratories. Verwenden Sie diese nicht, da die Leistung beeinträchtigt werden kann.
- Halten Sie die Reagenzien vom Probematerial getrennt, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Nach Ablauf des angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta-labs.com.tr](mailto:rta@rta-labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta-labs.com.tr](http://www.rta-labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



# Leistungsmerkmale

## Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze für Assays auf Nukleinsäurebasis 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 (MBC137-R) für den Wildtypkanal und VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.617.2 (MBC141-R) RNA CONTROL für Mutante-Kanal analysiert. 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 Amplifikation, 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 2:** DIAGNOVITAL T478K Mutationsnachweis - Grenzwerte der Nachweisgrenze (LoD) und 95 % Konfidenzbereiche

Zielgen	Nachweisgrenze (Kopien/ml)	95 % Konfidenz untere Grenze	95 % Konfidenz obere Grenze
T478	10207,933	7375,797	24393,619
K478	6946,681	5198,927	12450,442

## Diagnostische Spezifität

Insgesamt 192 klinische Proben, die von Patienten mit Covid-Symptomen gesammelt wurden, wurden mit dem **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** analysiert und die Ergebnisse mit der Sequenzanalyse der nächsten Generation verglichen. 150 von ihnen waren negativ für die T478K-Mutation und 42 von ihnen wurden mit beiden Methoden als positiv befunden. Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** in Bezug auf NGS beträgt 100 % und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) beträgt 100 %. Alle internen Kontrollen (RNAseP) wurden positiv getestet.

**Tabelle 3.** DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit – NGS qPCR Korrelationsstudie

NP-Abstrich		Komparator (NGS und qPCR)	
		Mutante	Wildtyp
DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit	T478	42	0
	K478	0	150
	Total	42	150

## Überlegungen vor dem Start

### Biosicherheit

- Tragen Sie bei der Arbeit mit klinischen Proben geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Kittel, puderfreie Handschuhe, Augenschutz).



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



- 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 (PUIs) auf das neuartige Coronavirus 2019 (SARS-CoV-2)  
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/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 T478K Mutationsnachweis-Kit und die Datenauswertung sind ausschließlich geschultem Laborpersonal vorbehalten.
- 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 Abstrichen mit einer synthetischen Spitze (wie Polyester oder Dacron\*) und Kunststoffstab entnommen werden. Abstriche mit Calciumalginat oder Wattestäbchen aus Holz sind nicht akzeptabel.

## Proben – Handhabung und Lagerung

- Die Proben können bei 2-8°C bis zu 72 Stunden nach der Entnahme aufbewahrt werden.
- Wenn eine Verzögerung des Extraktionsprozesses zu erwarten ist, Proben bei -20 °C oder niedriger lagern.
- Extrahierte Nukleinsäuren sollten bei -20°C oder niedriger gelagert werden.

Verwenden Sie keine Proben, wenn

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

## Probenvorbereitung

- Die Leistung des RT-PCR-Assays hängt stark von der Menge und Qualität der RNA-Probenvorlage ab. Es wird dringend empfohlen, RNA-Extraktionsverfahren auf Wiederherstellung und Reinheit zu qualifizieren und zu validieren, bevor Proben getestet werden.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** wird mit dem RTA Viral RNA Isolation Kit validiert.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K 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 5DX.
- 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.
- 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
 Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
 Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
 Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
 Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
 RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



- Je nach Probentyp können Patientenproben direkt verwendet werden. Dies kann jedoch einen vorherigen Lyseschritt und die Titration der Menge an Probe erfordern, die ohne Hemmung der Reaktion verwendet werden kann. Dieses Verfahren ist nicht validiert, eine Verwendung von isolierter RNA wird empfohlen.

## Reaktionsvorbereitung

1. Stellen Sie sicher, dass das erforderliche Equipment und Geräte geeignet, kalibriert und funktionsfähig sind, bevor Sie mit den Experimenten beginnen.
2. Dekontaminieren Sie die Ausrüstung und den Arbeitsbereich und bereiten Sie alles vor, was für das folgende Experiment benötigt wird, um den Arbeitsablauf kurz und wiederholbar zu gestalten.
3. Schalten Sie das PCR-Nachweissystem ein und programmieren Sie es, um Verzögerungen nach dem Einrichten der Reaktionen zu vermeiden.
4. Tauen Sie alle Komponenten des **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K 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 T478K Mutationsnachweis-Kit** gelieferte **PCR Mastermix** 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>Total</b>	<b>20</b>


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

	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 Mastermix mit den einzelnen Assay-Mischungen**

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

**Tabelle 3: DIAGNOVITAL SARS-COV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit thermisches Profil**

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Umgekehrte Transkription	1	50°C	10 Minuten
Anfängliche Denaturierung	1	95°C	2 Minuten
Verstärkung	40	95°C	5 Sekunden
		57°C * 	30 Sekunden

\*Datenerfassung aktivieren für: **FAM™** (Wild Type T478 SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (K478 SARS-CoV-2-Mutation) und **Cy5** (HEC).

8. Nachdem der Lauf beendet ist, dürfen die Reaktionsröhrchen nicht geöffnet werden, um eine Kontamination zu vermeiden, und müssen gemäß den örtlichen Richtlinien und Vorschriften entsorgt werden. Nicht autoklavieren, da dies die Laborausüstung mit Amplikonen kontaminieren kann.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0





# Analyse & Fehlerbehebung

## BEISPIELERGEBNISSE

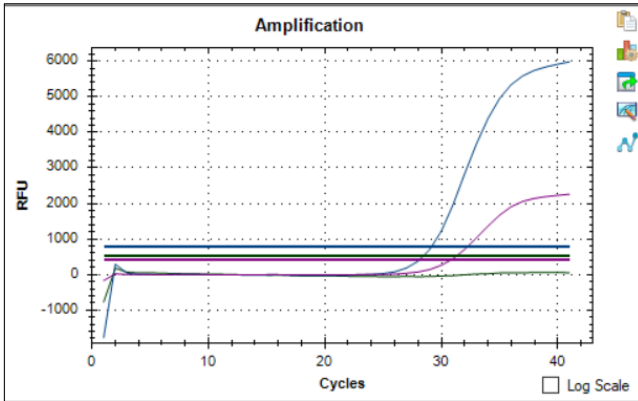


Abbildung 2: Blaue Kurven: T478 Wildtyp-Probe am FAM-Kanal, Lila Kurven: interne Kontrolle am Cy5-Kanal.

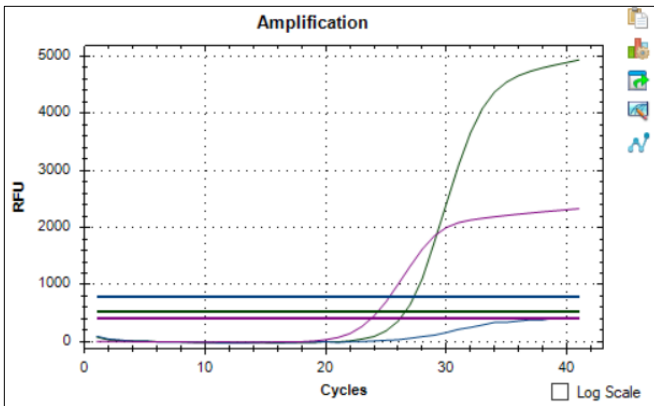


Abbildung 3: Grüne Kurven: T478 Mutante positive Probe am HEX Kanal, Lila Kurven: interne Kontrolle am Cy5 Kanal.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkiye Telefon: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## Ergebnisinterpretation

- **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 RNA-/DNA-Proben kontaminiert. Dekontaminieren Sie die Ausrüstung und den Arbeitsbereich und wiederholen Sie die Reaktionen.
- **Alle Reaktionen, die RNA-Isolat enthalten, müssen positive Ct-Werte für den internen Kontroll-Assay ergeben. Die Ct-Werte sollten ≤ 38 Zyklen sein.** Wenn die interne Kontrolle nicht amplifiziert 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.
- **Damit eine Probe als negativ für die T478K-Mutation angesehen wird, müssen die FAM™- und Cy5-Kanäle einen positiven Ct-Wert von ≤ 38 Zyklen ergeben. Eine Amplifikation der HEC im Cy5-Kanal wird um Ct 20-38 erwartet.**
- **Damit eine Probe als positiv für die T478K-Mutation angesehen wird, muss der HEX/VIC-Kanal einen positiven Ct-Wert von ≤ 38 Zyklen aufweisen. Eine Amplifikation der HEC im Cy5-Kanal wird um Ct 20-38 erwartet. Sollte sich der HEC nicht amplifizieren, muss die Probe dennoch als positiv betrachtet werden. Dieses Ergebnis ist möglich, wenn ein ungewöhnlich hoher Virustiter vorliegt oder die Probe nicht menschlichen Ursprungs ist, aber Zellkultur abgeleitet oder Analyse der Oberflächenkontamination.**
- **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 beeinträchtigt. 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 als **NEGATIV** betrachtet werden.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Ergebnis
-	-	+	Die Probe ist negativ für SARS-CoV-2. Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, die sich zuvor als SARS-CoV-2-positiv erwiesen haben. - Stellen Sie sicher, dass die Probe SARS-CoV-2-positiv ist. - Variationen in der Sondenbindungsregionen-Sequenzanalyse mit einer anderen Methode werden empfohlen.
+	-	+	Die Probe ist <b>negativ</b> für die T478K-Mutation.
-	+	+	Die Probe ist <b>positiv</b> für die T478K-Mutation.
-	-	-	Keine Amplifikation 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> .



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## 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.

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 Schwellenwerteinstellungen

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-Signalthöhe eingestellt werden.

Die Basislinie der Amplifikationskurve 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 Amplifikation aufgetreten ist. Auto-Schwellenwert wird mit **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 T478K Mutationsnachweis-Kit** für PCR-Detektionssysteme verwendet. Wenn der Anstieg einer Probe in einem Kanal **weniger als 10 %** des Anstiegs der **Positivkontrolle** 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 vs. HEX-Signalthöhe 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.



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## Fehlerbehebung

PROBLEM	MÖGLICHE GRÜNDE	LÖSUNG
<b>Negatives Ergebnis für interne Kontrolle</b>	Der PCR Master Mix war möglicherweise nicht homogen.	Das Pipettieren sollte für den PCR Mastermix durchgeführt werden.
	Die RNA-Isolierung kann möglicherweise nicht richtig durchgeführt werden.	Die Studie sollte aus der Isolation wiederholt werden.
	Isolat kann einen Inhibitor enthalten.	Die Real-Time-PCR-Phase sollte wiederholt werden, indem das Isolat 1/10 verdünnt wird.
<b>Positives Ergebnis für NTC</b>	Möglicherweise ist eine Kontamination aufgetreten.	Vom Arbeitsbereich bis zu den Verbrauchsmaterialien, an denen gearbeitet wird, kann eine Kontamination aufgetreten sein. 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.

## Einschränkungen

- Dieses Kit wurde nur für Proben entwickelt, 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 Zyklusprotokolls können zu fehlgeschlagenen Experimenten führen.
- Abhängig von der Probenmatrix können Inhibitoren in der isolierten RNA vorhanden sein und die umgekehrte Transkription und/oder PCR-Amplifikation deaktivieren. Wenn dies der Fall ist, kann ein anderer Probentyp oder eine andere Isolationsmethode von Vorteil sein.
- Spontane Mutationen innerhalb der Zielsequenz können dazu führen, dass die Zielsequenz nicht erkannt wird.
- Die Ergebnisse müssen immer unter Berücksichtigung aller anderen, aus einer Probe gewonnenen, Daten interpretiert werden. Die Interpretation muss von Personal vorgenommen werden, das für diese Art von Experimenten ausgebildet und erfahren ist.

## Markenzeichen

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

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



RTA Laboratuvarları

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr. 3 41400  
Gebze / Kocaeli / Türkei **Telefon:** +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-Mail: [rta@rta-labs.com.tr](mailto:rta@rta-labs.com.tr)  
Webseite: [www.rta-labs.com.tr](http://www.rta-labs.com.tr)  
RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.: 0



## Symbole



Verfallsdatum



Lot/ Batch



Katalognummer



Temperaturbegrenzung



Achtung



Hersteller



Lesen Sie die Gebrauchsanweisung  
oder die elektronische  
Gebrauchsanweisung



Enthält ausreichend für (n) Mengentests



Nur für Forschungszwecke.



**RTA LABORATUVARLARI**  
**BIYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ VE**  
**MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.**

GEPOSB Cumhuriyet Cad. Nr:3  
41400 Gebze / Kocaeli / Türkei

Tel: +90 262 648 5300

E-Mail: [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

Internet: [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. Nr. 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)

**Webseite:** [www.rta\\_labs.com.tr](http://www.rta_labs.com.tr)

**RTA-Revisionsdatum/Revisionsnr.:** 0

