SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Virus-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp)-Gen

REF MD03201, 96 Bestimmungen

Nur für den professionellen Gebrauch in der* In-vitro-*Diagnostik

IVD

DE

Gebrauchsanweisung

MD0320_IM_de

VERSION 2401, Januar 2024

NZYtech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Inhalt

1. Einführung ... 3
2. Verwendungszweck ... 3
3. Prinzipien des Tests ... 3
4. Zusammensetzung des Kits ... 3
5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung ... 4
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente ... 4
7. Probenentnahme und -vorbereitung ... 4
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise ... 4
   8.1 Sicherheitshinweise ... 4
   8.2 Anforderungen für die Handhabung und das Verfahren ... 4
9. Prüfverfahren ... 5
   9.1 Reaktionseinrichtung ... 5
   9.2 Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments ... 5
10. Datenanalyse ... 6
   10.1 Kriterien für die Laufvalidierung ... 6
   10.2 Interpretation der Testergebnisse ... 6
11. Bewertung der Performance ... 7
   11.1 Erwartete Ergebnisse ... 7
   11.2 Analytische Sensitivität ... 7
   11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität ... 7
   11.4 Präzision ... 7
   11.4.1 Wiederholpräzision ... 8
   11.4.2 Tägliche Reproduzierbarkeit ... 8
   11.4.3 Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge ... 8
   11.4.4 Operator-Reproduzierbarkeit ... 8
   11.4.5 Geräteübergreifende und laborinterne Reproduzierbarkeit ... 8
   11.5 Klinische Bewertung ... 8
12. Qualitätskontrolle ... 8
13. Technischer Support ... 9
14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse ... 9
15. Erläuterung der Symbole ... 9
16. Konformitätserklärung ... 10
17. Referenzen ... 11

1. Einführung

Ende 2019 wurde in China eine neue akute Atemwegserkrankung namens Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) gemeldet, die sich rasch weltweit ausbreitete. Als Erreger wurde das Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) [Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom] identifiziert. Das Virus (zuvor 2019-nCoV genannt) gehört innerhalb der Familie der Coronaviren, wie das eng verwandte SARS-Coronavirus (SARS-CoV) auch, zur Gattung der Betacoronaviren. Coronaviren sind behüllte, positive, einzelsträngige große RNA-Viren, die den Menschen, aber auch eine Vielzahl von Tieren infizieren. Man geht davon aus, dass SARS-CoV-2 zoonotischen Ursprungs ist und sich wahrscheinlich von großen Meeresfrüchte- und Tiermärkten durch den Kontakt von Mensch und Tier in der Stadt Wuhan verbreitet hat. Das neuartige Coronavirus ist hoch ansteckend und wird primär über Atemtröpfchen (Husten und Niesen) übertragen. Die Früherkennung von SARS-CoV-2 ist für eine rasche Behandlung infizierter Patienten und damit für die Eindämmung der Ausbreitung von Infektionen von entscheidender Bedeutung. Zu den häufigsten klinischen Manifestationen von COVID-19 gehören Müdigkeit, Fieber und Symptome der unteren Atemwege, wie trockener Husten und Atemnot. Auch Geruchs- und Geschmacksverlust können auftreten. In den kritischsten Situationen entwickelt sich die Infektion zu einer schweren Lungenentzündung mit lebensbedrohlichen Komplikationen wie akutem Atemwegssyndrom, Organfunktionsstörungen und Tod. Nach heutigem Kenntnisstand sind etwa 80% der Infektionen mild oder asymptomatisch. Ein Prozentsatz der Bevölkerung ist anfälliger für die schwere Form der Krankheit, darunter ältere Erwachsene (50 Jahre und älter), Raucher und Menschen mit chronischen Krankheiten wie Herz- oder Lungenerkrankungen, Krebs, Diabetes und Patienten mit einem geschwächten Immunsystem.

2. Verwendungszweck

Das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD ist ein molekularer Test für den schnellen qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren des CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) des schweren akuten Atemwegssyndroms in Nasen- und Rachenabstrichen oder Sputumproben von Patienten. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin, die aus einer Infektion mit dem neuartigen humanen Coronavirus resultiert. Die Tests sind auf die Verwendung durch im Labor geschultes Personal beschränkt, das speziell in Echtzeit-PCR-Techniken und in der *In-vitro*-Diagnostik unterwiesen wurde.

3. Prinzipien des Tests

Das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD bietet den kompletten Satz an Reagenzien und Sonden zum qualitativen Nachweis des SARS-CoV-2 Genoms über gängige Echtzeit-PCR-Plattformen (siehe erforderliche Gerätespezifikationen in **Abschnitt 6**). Im Einzelnen weist das Kit das Vorhandensein einer RNA-Sequenz des SARS-CoV-2-Gens nach, das für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) kodiert. Eine interne Kontrolle ist enthalten, um u.a. die effiziente RNA-Extraktion aus humanen biologischen Proben sowie das Fehlen von PCR-Inhibitoren zu bestätigen. Darüber hinaus verwendet der Test externe Kontrollen (positive Untertiterkontrolle, die mit dem Kit geliefert wird, und negative Kontrolle), wie unten beschrieben. SARS-CoV-2-Primer und -Sonde haben eine 100%-ige Homologie mit >95% von >2500 Genomsequenzen, die seit dem 29. März 2020 in der GISAID-Datenbank verfügbar sind. Darüber hinaus weisen Primer und Sonden, die auf das SARS-CoV-2-Genom abzielen, keine signifikante Homologie mit nicht verwandten Genomen auf, was diesen hochspezifischen Test ermöglicht, da es keine Kreuzreaktivität mit anderen bisher sequenzierten Coronaviren gibt. Die natürliche Entwicklung von SARS-CoV-2 beinhaltet auch, dass nach dem anfänglichen Design dieses Kits neue Sequenzinformationen verfügbar werden, die die Anpassungsstrategien von SARS-CoV-2 widerspiegeln. Daher überprüft NZYtech regelmäßig SARS-CoV-2 Targets und wird, falls erforderlich, neue Versionen dieses Kits herausgeben.

Die qualitative Bestimmung der spezifischen RNA basiert auf der einstufigen Echtzeit-RT-PCR-Technologie, da es sich hierbei um eine schnelle und zuverlässige Methode zum genauen Nachweis von SARS-CoV-2 handelt. Unter Verwendung des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD wird RNA, die in Verbindung mit einem CE IVD-Extraktionssystem isoliert und gereinigt wurde, in einer einzigen Reaktion unter Verwendung von zwei hochspezifischen Primern/Sonden-Sets, die das so genannte TaqMan®-Prinzip nutzen, in cDNA retrotranskribiert (RT) und anschließend durch PCR amplifiziert. Wenn die aus Atemwegsproben extrahierte RNA von einem infizierten Patienten entnommen wird, bindet eine TaqMan®-Sonde spezifisch an eine konservierte Region des SARS-CoV-2 RdRp-Gens, die von einem ebenso spezifischen Primerpaar umgeben wird. Ein zusätzliches Primer/Sonden-Set dient als interne Kontrolle zum Nachweis von Nukleinsäuren der humanen Ribonuklease P [RNase P-Gen (RP)], wodurch die Wirksamkeit des Extraktionsprozesses aus humanem abgeleiteten biologischen Material bestätigt werden kann. Darüber hinaus ermöglicht diese interne Kontrolle den Nachweis, dass keine Reaktionshemmung durch potenziell in den klinischen Proben vorhandene PCR-Inhibitoren aufgetreten ist. Die beiden Sonden sind unterschiedlich mit FAM™ und JOE™ Reporterfarbstoffen markiert, um die individuelle Amplifikation der viralen und humanen Targets in einer einzigen Reaktion identifizieren zu können. Darüber hinaus werden sie in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, um sicherzustellen, dass die Amplifikation von humaner mRNA, auch wenn sie in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, die Effizienz des SARS-CoV-2 Primer/Sonden-Sets nicht einschränkt. Das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD enthält eine Positivkontrolle, die die Kontrolle der Performance von RT-PCR-Reaktionen ermöglicht. Diese Kontrolle entspricht einem synthetischen Nukleinsäuremolekül, das Sequenzen trägt, die sowohl zu den SARS-CoV-2 als auch zu den RP-Zielsequenzen, die in diesem Detektionstest enthalten sind, homolog sind. Die SARS-CoV-2/RP-Positivkontrolle sollte jedes Mal, wenn ein Array von Proben getestet wird, direkt mit dem SARS-CoV-2/RP Primer/Sonden-Mix verwendet werden. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Primer und Sonden-Sets zum Nachweis der SARS-CoV-2- und RP-Zielgene in der mitgelieferten Master-Mischung in diesem speziellen experimentellen Szenario ordnungsgemäß funktionierten. Wird ein negatives Ergebnis erzielt, sind die Testergebnisse ungültig und müssen wiederholt werden.

4. Zusammensetzung des Kits

Das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD bietet einen umfassenden Reagenziensatz, der ausreicht, um 96 RT-PCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

BESTANDTEILE DES KITS		ANZAHL DER FLÄSCHCHEN	VOLUMEN (PRO FLÄSCHCHEN)
SARS-CoV-2 MMix	NZYSpeedy One-step RT-qPCR Master Mix	1	1050 µL
SARS-CoV-2 PPMix	SARS-CoV-2/RP Primer/Sonden-Mischung	1	205 µL
SARS-CoV-2 Pos	SARS-CoV-2/RP Positivkontrolle (1 x 10^4 Kopien/µL)	1	105 µL
SARS-CoV-2 Neg	RNase/DNase-freies Wasser	1	105 µL

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung

Das SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD wird gekühlt verschickt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85 °C to -15 °C gelagert werden. Bei Verwendung sollten die Kit-Komponenten sofort nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückgelegt werden, um die Zeit in Raumtemperatur-Umgebung zu minimieren.

- Minimieren Sie die Anzahl der Einfrier-Auftauzyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquoten. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleinere Volumen aliquotiert werden.
- Die SARS-CoV-2/RP Primer/Sonden-Mix sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere darf der NZYSpeedy One-step RT-qPCR Master Mix nach der Kombination mit Primern/Sonden-Mix nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.
- Setzen Sie sich sofort mit NZYtech in Verbindung, wenn die Verpackung, die das Kit schützt, bei der Ankunft beschädigt ist.
- Achten Sie auf das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum. NZYtech rät davon ab, das Kit nach dem Verfallsdatum zu verwenden. An diesem Datum muss das Kit gemäß den Entsorgungsanweisungen in **Abschnitt 8.2** entsorgt werden.

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente

- Ein Echtzeit-PCR-Instrument, das die Fluoreszenzfarbstoffe FAM™ und JOE™ nachweist (bei Emissionswellenlängen von 520 bzw. 555 nm). Siehe in Abschnitt 11 die Gerätemodelle, für die das Kit validiert wurde.
- Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Isolierung viraler RNA aus respiratorischen Proben.
- RNase/DNase-freie qPCR-Plastikgeräte: PCR-Gefäße, Streifen, Kappen, 96-Well-Platten, Klebefilme.
- Pipettierer und Filterspitzen (RNase/DNase frei).
- Einweghandschuhe.
- Vortex und Zentrifuge.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Verschiedene Faktoren, wie z. B. das Protokoll für die Probenentnahme aus menschlichen Atemproben (Nasen-Rachen- oder Oropharynxabstriche oder Sputum), der Probentransport, die Lagerung und die Verarbeitungszeit, sind entscheidend, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Sputumproben müssen aus dem unteren Respirationstrakt stammen. Die gesammelten Proben sollten so bald wie möglich getestet werden. Die Proben sind bei niedrigen Temperaturen gemäß den Vorschriften zur biologischen Sicherheit zu transportieren und zu lagern. RNA oder Gesamtnukleinsäuren, die nach einem CE IVD-Protokoll extrahiert wurden, sind das Ausgangsmaterial für den NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD. Bitte stellen Sie sicher, dass die RNA-Proben in Bezug auf Reinheit, Konzentration und Nukleinsäureintegrität geeignet sind. Ein $A_{260/280}$ Verhältnis von ~2 wird im Allgemeinen für reine RNA akzeptiert. Da Ethanol ein starker Real-Time PCR-Inhibitor ist, muss er vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig eliminiert werden. Das NZYtech-Kit integriert eine interne RNA-Extraktionskontrollreaktion, die auf humane RNA abzielt, die zusammen mit viraler RNA gereinigt wird. Humane RNA wird mit dem RNase P (RP) Primer/Sonden-Set amplifiziert. Dies ist nützlich, um die Effizienz der RNA-Isolierung und/oder das Vorhandensein von Inhibitoren während der Probenverarbeitung zu überprüfen.

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Wie bei jedem analytischen Testverfahren ist eine gute Laborpraxis unerlässlich. Befolgen Sie sorgfältig die in diesem Handbuch angegebenen Verfahren und Richtlinien, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Jede Abweichung davon kann zum Versagen des Tests führen oder fehlerhafte Ergebnisse verursachen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Kits muss besonders darauf geachtet werden, Reagenzien und Amplifikationsmischungen frei von Kontaminationen zu halten.

8.1 Sicherheitshinweise

Bevor Sie das Kit verwenden, lesen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf NZYtech Website verfügbar ist (www.nzytech.com). Der Nachweis des SARS-CoV-2-Virus sollte nur von Personal geführt werden, das in entsprechend ausgestatteten Laboratorien in den entsprechenden technischen und sicherheitstechnischen Verfahren geschult wurde. Internationale und nationale Richtlinien zur biologischen Sicherheit von Laboratorien sollten unter allen Umständen befolgt werden.

8.2 Anforderungen für die Handhabung und das Verfahren

- Nur für den professionellen *In-vitro*-Diagnostischen Gebrauch.
- Dieses Kit nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verwenden Sie die Testkomponenten nicht, wenn die Versiegelung des Kits beschädigt ist.
- Tauschen Sie keine Reagenzien verschiedener Produktionschargen aus.
- Es dürfen keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Bei allen Verfahren sollten DNase/RNase-freie Einweg-Plastikbehälter und Pipetten verwendet werden.
- Verwenden Sie während des gesamten Protokolls DNase/RNase-freie Filterspitzen, um eine Kontamination mit Aerosolen und Flüssigkeiten zu verhindern.

- Probenvorbereitung, Reaktionsaufbau und Amplifikation sollten in verschiedenen Arbeitsbereichen durchgeführt werden.
- Die Positivkontrollvorlage enthält eine große Anzahl von Vorlagen. Sie sollte geöffnet und außerhalb der Testproben und Kit-Komponenten verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie stets das im Kit mitgelieferte Wasser (SARS-CoV-2 Neg - RNase/DNase-freies Wasser).
- Reinigen Sie Arbeitsflächen und Ausrüstung am Ende jedes Tests mit einem DNA/RNA-Entferner.
- Behandeln Sie die Post-Amplifikationsplatten mit Sorgfalt und entsorgen Sie sie unmittelbar nach Abschluss des Tests. Die Platten sollten nach Gebrauch stets in einen geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden.
- Biologische Proben sollten unter Beachtung der entsprechenden Biosicherheitsvorkehrungen so behandelt werden, als ob sie infektiös wären.
- Rückstände von Chemikalien und Präparaten werden im Allgemeinen als gefährlicher Abfall betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfall wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt.
- Alle Ergebnisse sollten von einem Angehörigen eines Gesundheitsberufs im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den klinischen Symptomen des Patienten interpretiert werden.
- Dieser Test kann durch andere Krankheitserreger verursachte Krankheiten nicht ausschließen.
- Ein negatives Ergebnis für einen PCR-Test schließt die Möglichkeit einer Infektion nicht endgültig aus.
- Befolgen Sie die guten Laborpraktiken, tragen Sie Schutzkleidung, tragen Sie ständig puderfreie Einweghandschuhe, tragen Sie Schutzbrille und Maske. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht im Arbeitsbereich.

9. Prüfverfahren

Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Tests sorgfältig durch. Denken Sie daran, dass alle Pipettierschritte und der Versuchsplattenaufbau auf Eis durchgeführt werden sollten. Nachdem die Platte gegossen ist, beginnen Sie sofort mit dem One-step RT-PCR-Protokoll. Längere Inkubation von Reaktionsgemischen bei Raumtemperatur kann zu PCR-Artefakten führen, die die Nachweisempfindlichkeit verringern. Beginnen Sie vor dem Experiment, die mitgelieferten Reaktionsgefäße vorsichtig zu mischen, zentrifugieren Sie 5 Sekunden lang, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu sammeln, und stellen Sie die Gefäße auf Eis. **Pipettieren Sie die SARS-CoV-2/RP-Positivkontrolle immer zuletzt, um Kontaminationsereignisse zu vermeiden.**

9.1 Reaktionseinrichtung

1. Bereiten Sie eine RT-PCR-Mischung vor, die für die Anzahl der durchzuführenden SARS-CoV-2/RNase P-Tests ausreicht, mit einem zusätzlichen Volumen von 5% für Pipettierungsverluste. Gehen Sie nach der folgenden Tabelle vor, in der die Volumina für 1 und n Tests angegeben sind (wobei n der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht):

KOMPONENTE	1 TEST VOLUMEN (µL)	n PRÜFUNGEN (*) VOLUMEN + 5% (µL)
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix	2	*n* x 2,1
FINALES VOLUMENT	**12**	***n* x 12,6**

(*) Um die Gesamtzahl der für jeden Test erforderlichen Reaktionen zu berechnen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie zwei weitere für die Negativ-bzw. Positivkontrollen hinzu.

2. Pipettieren Sie 12 µL des RT-PCR-Mixes in die einzelnen Vertiefungen entsprechend Ihrem Real-Time PCR-Experimentierplatten-Setup.
3. Geben Sie für die Negativkontrolle 8 µL SARS-CoV-2 Neg anstelle des RNA-Templates in die Negativkontrollvertiefung. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
4. Für die biologischen Proben geben Sie 8 µL jeder RNA-Probe in die SARS-CoV-2/RNase P-Vertiefungen entsprechend Ihrer experimentellen Plattenanordnung. Das Endvolumen sollte je 20 µL betragen.
5. Geben Sie für die Positivkontrolle 8 µL SARS-CoV-2 Pos anstelle des RNA-Templates in die Positivkontrollvertiefung. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
6. Versiegeln Sie die Reaktionsplatte, die alle Reaktionen enthält, und zentrifugieren Sie sie kurz herunter, bevor Sie mit der RT-PCR und den Detektionsschritten fortfahren.
7. Platzieren Sie die Reaktionsplatte in das Real-Time PCR-Gerät und führen Sie das RT-PCR-Protokoll wie im folgenden Abschnitt beschrieben aus.

9.2 Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments

Die unten stehende Tabelle zeigt ein Standardprotokoll, das für eine Reihe von Plattformen optimiert wurde. Diese Bedingungen können jedoch angepasst und validiert werden, um verschiedenen maschinenspezifischen Protokollen gerecht zu werden.

Vorgeschlagene RT-PCR-Lauf-Einstellungen

ZYKLEN	TEMPERATUR	ZEIT	SCHRITT
1	50 °C	20 min	Umgekehrte Transkription
1	95 °C	2 min	Polymerase-Aktivierung
40	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Glühen/Erweiterung

Fluoreszierende Detektoren/Farbstoffe

TARGET	FLUORESZIERENDER FARBSTOFF	DETEKTIONSKANÄLE
SARS-CoV-2 & RNase P Targets	FAM™ & JOE™	FAM
Positiv/Negativ-Kontrollen	FAM™ & JOE™	JOE, VIC oder HEX

Das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD wurde für die folgenden Real Time PCR Systeme validiert: Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus und Bio-Rad® CFX96™. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit durch den Anwender unter Verwendung vorher charakterisierter Proben (sowohl positiv als auch negativ) validiert werden.

10. Datenanalyse

10.1 Kriterien für die Laufvalidierung

Wir empfehlen, vor der Analyse der Probenergebnisse zu überprüfen, ob der Echtzeit-PCR-Test gültig ist. Bitte bestätigen Sie daher für jede Platte, ob die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen erwartungsgemäß in Übereinstimmung mit den folgenden Kriterien durchgeführt wurden:

Positivkontrolle: Die Amplifikationskurven von FAM™ (SARS-CoV-2) und JOE™ (RP) sind positiv. Es wird erwartet, dass sich die Positivkontrolle bei einem Ct<28 verstärkt, sowohl im FAM als auch im JOE Kanal. Die Nichterfüllung dieses Qualitätskontrollkriteriums ist ein starker Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Negativkontrolle (keine Template-Reaktion): Es wird keine Amplifikation festgestellt. Wenn die Negativkontrolle eine oder zwei Amplifikationskurven (FAM™ und/oder JOE™) mit einer sigmoidalen Form aufweist, kann es zu einer Probenkontamination gekommen sein. Wiederholen Sie den Test nach guter RT-PCR-Praxis.

Wenn die Kontrollen den Erwartungen entsprechen, ist der Test **gültig**. Bitte fahren Sie mit der Interpretation der Ergebnisse für die getesteten Proben fort.

Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Performance zeigt, wurde der Test beeinträchtigt oder unsachgemäß durchgeführt und sollte als ungültig betrachtet werden.
Bitte wiederholen Sie den Test.
Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller

10.2 Interpretation der Testergebnisse

SARS-CoV-2 gilt als nachgewiesen, wenn die Verstärkungskurve von FAM™ eine sigmoidale Form mit einem Ct<36 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RP-Test (JOE™) erzielt wird.

SARS-CoV-2 gilt als nicht erkannt, wenn die FAM™ Kurve nicht positiv ist (Ct=36), während die RP (JOE™) eine positive Sigmoidkurve (Ct<40) aufweist.

Der **Test ist ungültig**, wenn der SARS-CoV-2- und der RP-Test beide negativ sind. Der Test sollte mit wieder gereinigter Nukleinsäure aus der Probe wiederholt werden.

Die folgende Tabelle fasst die Interpretation der wichtigsten Ergebnisse zusammen (bewerten Sie die Gesamtform der Amplifikationskurven; **nur sigmoidale Amplifikationskurven sind indikativ für eine echte Amplifikation**).

SARS-CoV-2 ERGEBNIS SARS-CoV-2, CT (FAM™)	**RP ERGEBNIS** RP, CT (JOE™)	**INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**
+ (Ct<36)	**+** (Ct<40)	SARS-CoV-2 entdeckt → POSITIV
+ (Ct<36)	**-** (Ct>40)	SARS-CoV-2 entdeckt → POSITIV
- (Ct≥36)	**+** (Ct<40)	SARS-CoV-2 entdeckt → NEGATIV
- (Ct≥36)	**-** (Ct>40)	Ungültiger Test, wiederholen Sie die Extraktion und den Test

Hinweis: *Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.*

- Falsch negative Ergebnisse können verursacht werden durch:
  - Ungeeignete Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung von Proben.
  - Probe außerhalb der virämischen Phase.
  - Nichtbeachtung der Verfahren in diesem Handbuch.
  - Verwendung eines nicht zugelassenen Extraktions-Kits oder Echtzeit-PCR-Plattform.

- Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:
  - Ungeeignete Handhabung von Proben, die eine hohe Konzentration an viraler SARS-CoV-2-RNA oder ein positives Kontrolltemplate enthalten.
  - Ungeeignete Handhabung des SARS-CoV-2 Pos-Röhrchens.
  - Ungeeignete Handhabung des amplifizierten Produkts (Post-Amplifikations-Platte).

11. Bewertung der Performance

Die Evaluierung der Performance des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD wurde auf dem Applied Biosystems® 7500 und Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR System mit zusätzlichen Tests auf dem Applied Biosystems® StepOnePlus Real Time PCR System durchgeführt. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit durch den Anwender unter Verwendung vorher charakterisierter Proben (sowohl positiv als auch negativ) validiert werden.

11.1 Erwartete Ergebnisse

Ein typischer Amplifikationsplot, der für eine klinische Probe, die SARS-CoV-2-Nukleinsäuren enthält, beobachtet wurde, ist unten dargestellt.

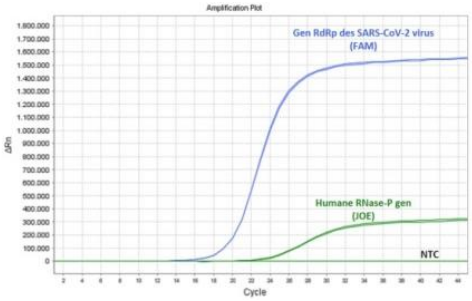

Abbildung 1. Gleichzeitiger Nachweis von SARS-CoV-2- und Human-RNase-P-Targets aus einer positiven klinischen Probe (mit SARS-CoV-2 infizierter Patient). Blaue Kurve: Nachweis des viralen RNA-Ziels von SARS-CoV-2 (RdRp-Gen) über den Kanal FAM; Grüne Kurve: Nachweis des humanen RNase-P-Gens durch den Kanal JOE. NTC, keine Template-Kontrolle (Negativkontrolle).

11.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, die mit 95%iger Sicherheit zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch Testen von SARS-CoV-2-Nukleinsäuren bei verschiedenen Kopienzahlen (5 x 10^4 bis 2,5 Kopien pro Reaktion) beurteilt; 2,5 x 10^3 bis 0,125 Kopien/µL), einzeln oder in RNA gespikt, die aus negativen oropharyngealen Proben extrahiert wurde, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen bei typischen Testreaktionsbedingungen. Die Tests wurden 5 Tage lang zweimal täglich wiederholt, wobei für jede getestete SARS-CoV-2-Konzentration 60 Replikate erzeugt wurden. Zusammen ergaben die Daten, dass das NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD 0,25 Kopien/µL der viralen RNA von SARS-CoV-2 mit einer Zuverlässigkeit von 95% nachweist. Somit beträgt die analytische Sensitivität des Kits, ausgedrückt als Limit of Detection (LoD) / Nachweisgrenze, 0,25 Kopien/µL oder 250 Kopien/mL. Die Kit-LoD wurde mit drei Kit-Chargen, zwei verschiedenen Geräten und von zwei verschiedenen Bedienern in einem Experiment mit insgesamt 48 Tests erneut validiert. Dabei wurde sichergestellt, dass die analytische Empfindlichkeit des Kits in verschiedenen Testsituationen beibehalten wurde. Die Kapazität des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD zum Nachweis des Virus bei verschiedenen Ladungen (von 5 x 10^7 bis 5 Kopien pro Reaktion) ist in der nachstehenden Abbildung dargestellt.

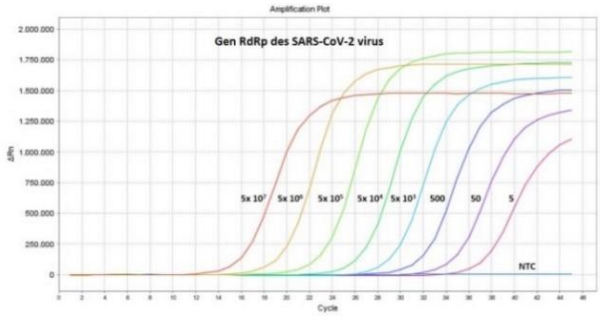

Abbildung 2. Sensitivität des SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD. Amplifikationsplot (Zykluszahl gegen Fluoreszenz - ΔRN) von 1:10 serielle Verdünnungen der SARS-CoV-2 vRNA, von 5 x10^7 Kopien bis 5 Kopien pro Reaktion durch den Kanal FAM. NTC, keine Template-Kontrolle (Negativkontrolle).

11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität

Die Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden durch in silico-Analyse gegen Pathogene, die mit SARS-CoV-2 verwandt sind, bzw. gegen normale Pathogene, die eine Infektion mit ähnlichen Symptomen verursachen, bewertet. Bei der in-silico-Analyse wurde festgestellt, dass das Testdesign alle SARS-CoV-2-Virusstämme nachweisen konnte und keine Reaktivität mit Nicht-SARS-CoV-2-Spezies zeigte. Zusätzlich zur in-silico-Analyse wurde SARS-CoV-2 RT-PCR an Nukleinsäuren üblicher Mikroben des Mund- und Respirationstraktes durchgeführt, einschließlich *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*.. Keiner der anderen durch den SARS-CoV-2 (COVID-19)-RT-PCR-Test getesteten Erreger erzeugte ein nachweisbares Amplifikationssignal.

11.4 Präzision

Die Test-Präzision für des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD wurde durch wiederholtes Testen von SARS-CoV-2-Nukleinsäuren bestimmt, die zwei Viruslaststufen repräsentieren: 5 (LoD) und 150 Kopien pro Reaktion (0,25 und 7,5 Kopien/µL), einzeln oder in RNA aus negativen Oropharynx-Proben gespickt, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen und unter typischen Testreaktionsbedingungen.

Die Präzision wurde in Form des Cq-Durchschnitts, des Cq-Variationskoeffizienten und des Replikatnachweises in % ausgedrückt, wie unten für jeden Fall beschrieben. Die Daten werden in der am Ende dieses Abschnitts angezeigten Tabelle aufgeführt.

11.4.1 Wiederholpräzision

Die Wiederholbarkeit wurde durch die Analyse von 48 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 96 Tests entspricht, die von zwei verschiedenen Bedienern durchgeführt wurden.

11.4.2 Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde durch die Analyse von 120 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) für 5 Tage mit 24 Replikaten jeder Konzentration pro Tag (insgesamt 240 Tests) bewertet.

11.4.3 Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde durch die Analyse von 270 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 90 Replikaten pro Charge bewertet.

11.4.4 Operator-Reproduzierbarkeit

Die Operator-Reproduzierbarkeit wurde durch Testen von 96 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 48 Tests entspricht, die von vier verschiedenen Bedienern durchgeführt wurden.

Präzision des SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

VARIABLE GETESTET		SARS-CoV-2 (KOPIEN/REAKTION)	
		5	**150**
WIEDERHOLPRÄZISION	n	48	48
	Mittlerer Cq	34,61	30,82
	Variationskoeffizient (%)	2,99	1,80
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	120	120
	Mittlerer Cq	33,02	30,49
	Variationskoeffizient (%)	4,21	4,95
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	270	270
	Mittlerer Cq	33,41	30,15
	Variationskoeffizient (%)	4,35	4,33
	% Replikat-Erkennung	100	100
OPERATOR-REPRODUZIERBARKEIT	n	96	96
	Mittlerer Cq	33,40	30,13
	Variationskoeffizient (%)	4,76	3,73
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	72	72
	Mittlerer Cq	33,44	29,98
	Variationskoeffizient (%)	5,24	3,72
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.4.5 Geräteübergreifende und laborinterne Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten wurde durch Testen von 36 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) in zwei verschiedenen qPCR-Instrumenten (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus) gemessen, insgesamt 72 Tests pro Instrument.

11.5 Klinische Bewertung

Die Performance des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD mit gesammelten respiratorischen klinischen Proben wurde in zwei verschiedenen Labors durchgeführt. Insgesamt wurden 100 klinisch negative und 100 klinisch positive Proben getestet. Die Daten zeigten, dass für alle 200 getesteten Proben eine 100%ige Übereinstimmung erreicht wurde.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD werden nach den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Duplex-Echtzeit-PCR-System ermöglicht den Nachweis der für die Identifizierung von SARS-CoV-2 und RNase P (RP) humaner mRNA beschriebenen Ziele. Positive Amplifikationen werden für Zielgene, Positivkontrollen und interne Kontrollen über die Kanäle FAM und JOE entsprechend den jeweiligen Primer/Sonden-Sets Reporterfarbstoffen beobachtet.

13. Technischer Support

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte telefonisch an unser engagiertes technisches Support-Team: +351 (0) 21 364 35 14 oder E-Mail: info@nzytech.com.

14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse

Alle in diesem Handbuch aufgeführten Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

15. Erläuterung der Symbole

IVD	*In-vitro*-Diagnostisches medizinisches Gerät		Gebrauchs-anweisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperatur-grenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer/Sonden-Mix)
CONTROL -	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, IVD

Katalognummer: MD03201

Verwendungszweck: Qualitativer SARS-CoV-2 Nachweis

Einstufung: Andere (nicht abgedeckt durch Anhang II oder nicht zum Eigenanwendung bestimmt) laut der Richtlinie 98/79/EG.

Hersteller: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038 Lisboa

Portugal

Wir, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, mit den folgenden Normen und anderen normativen Dokumenten ISO 9001:2015 und ISO 13485:2016 gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika, wie sie in nationales Recht der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzt wurde, konform ist.

Die technische Dokumentation wird gepflegt bei NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal, geführt.

Joana Brás, PhD

Technische Direktorin

17. Referenzen

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 März 2020. Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17. März 2020 Online verfügbar unter https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza

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

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics. Chem. Biol. 7(1) 63-72.

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

NZYtech
genes & enzymes

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com