SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes, IVD

Virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und Nukleokapsid-Phosphoprotein (N) Gene

REF

MD04831, 96 Reaktionen
MD04832, 4 x 96 Reaktionen

***Nur für den professionellen* in-vitro-*diagnostischen Gebrauch*.**

IVD

DE

Instructions for Use (IFU) / Gebrauchsanweisung

IM-002de

VERSION 11/2021, November 2021

NZYTech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, 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 4

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung 5

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente 5

7. Probenentnahme und -vorbereitung 6

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 6

8.1 Sicherheitshinweise 6

8.2 Handhabung und Verfahrensanforderungen 6

9. Prüfverfahren 7

9.1 Reaktionseinrichtung 7

9.2 Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments 8

10. Datenanalyse 9

10.1 Validierungskriterien für den Lauf 9

10.2 Interpretation der Testergebnisse 10

11. Performance-Bewertung 11

11.1 Erwartete Ergebnisse 11

11.2 Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität 11

11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität 12

11.4 Präzision 13

11.5 Klinische Bewertung 14

12. Qualitätskontrolle 15

13. Technischer Support 15

14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse 15

15. Erläuterung der Symbole 16

16. Konformitätserklärung 17

17. Referenzen 18

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 ist ein erheblicher Anteil der Infektionen mild oder asymptomatisch. Ein Prozentsatz der Bevölkerung ist anfälliger für die schwere Form der Krankheit, darunter ältere Erwachsene (60 Jahre und älter), Raucher und Menschen mit chronischen Krankheiten wie Herz- oder Lungenerkrankungen, Krebs, Diabetes und Patienten mit einem geschwächten Immunsystem. Gegenwärtig gibt es keine spezifische Behandlung gegen eine SARS-CoV-2-Infektion.

2. Verwendungszweck

NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) ist ein molekularer Test zum schnellen qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms verursachenden CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) in Nasen-Rachen- oder Oropharynxabstrichproben von Patienten. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin, aber eine klinische Korrelation mit der Patientengeschichte und anderen diagnostischen Informationen ist notwendig, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen des Patientenmanagements verwendet werden. Dieses Set ist für die Verwendung durch im Labor geschultes Personal vorgesehen, 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, RdRp and N genes (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**). Die Virus-RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und das Nucleocapsid-Phosphoprotein (N) Gen wurden zuvor als hochspezifische Marker für SARS-CoV-2 identifiziert. Dieser NZYTech-Kit zielt auf spezifische Regionen im RdRp und N Gen des SARS-CoV-2-Genoms ab, um die höchste

Nachweisempfindlichkeit zu erzielen. Die Primer und Sonden des SARS-CoV-2-Kits haben eine 100%ige Homologie mit >95% der >10.000 Genomsequenzen, die ab September 2020 in der GISAID-Datenbank verfügbar sind, und weisen keine anderen verbreiteten Coronaviren nach. Darüber hinaus weisen Primer und Sonden, die auf SARS-CoV-2 abzielen, keine signifikante Homologie mit nicht verwandten Genomen auf, was diesen Test hochspezifisch macht, da es keine Kreuzreaktivität mit Nukleinsäuren von anderen respiratorischen viralen und bakteriellen Organismen gibt. 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. Die Positivkontrolle besteht aus Nukleinsäurefragmenten, die die drei vom Kit detektierten Zielsequenzen (SARS-CoV-2, RdRp und N Gen, und humanes RP-Gen) enthalten. 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 genomische Targets und wird, falls erforderlich, neue Versionen dieses Kits herausgeben.

Der qualitative Nachweis von RNA basiert auf der einstufigen Echtzeit-RT-PCR-Technologie, da dies nach wie vor die empfindlichste Methode zur Durchführung eines genauen Nachweises von SARS-CoV-2 ist. Unter Verwendung des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR-Kits (IVD) wird RNA, die mit einem CE IVD-Extraktionssystem isoliert und gereinigt wurde, in einer einzigen Reaktion unter Verwendung von drei hochspezifischen Primern/Sonden-Sets, die das so genannte TaqMan®-Prinzip nutzen, in cDNA retrotranskribiert (RT) und anschließend durch PCR amplifiziert. Während dieses Prozesses heften sich die Sonden spezifisch an zwei Regionen des SARS-CoV-2-Genoms, nämlich RdRp (innerhalb des Orf1ab-Polyprotein-Gens) und N Gen, falls die Probe von einem infizierten Patienten extrahiert wurde. Ein zusätzliches Primer/Sonden-Set dient als endogene interne Kontrolle zum Nachweis von Nukleinsäuren der humanen Ribonuklease P [RNase P-Gen (RP)], um die Probenqualität zu beurteilen. Darüber hinaus bietet diese interne Kontrolle den Nachweis, dass keine Reaktionshemmung durch potenziell in den klinischen/umweltbezogenen Proben vorhandene PCR-Inhibitoren aufgetreten ist. Um die Identifizierung der Amplifikation der drei spezifischen Targets in einer einzigen Reaktion zu ermöglichen, sind die SARS-CoV-2- und die humanen RNase P-spezifischen Sonden unterschiedlich markiert, mit FAM™ bzw. JOE™ Reporterfarbstoffen. Beachten Sie, dass dieses Panel einen Duplex-Assay im gleichen optischen FAM-Kanal enthält, um über eine additive Leistung der beiden PCR-Assays für den SARS-Cov-2-Nachweis zu berichten. 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.

4. Zusammensetzung des Kits

Das NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) bietet einen umfassenden Reagenziensatz, der ausreicht, um 96 RT-PCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

Bestandteile des Kits		Volumen (pro Fläschchen)	MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp & N)	NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix	1025 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	SARS-CoV-2(RdRp & N Gene)/RP Primer/Sonden-Mix (FAM™ und JOE™ etikettiert)	220 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (RdRp & N Gene)/RP Positiv-Kontrolle (1 x 10^4 Kopien/µL)	120 µL	1	4
SARS-CoV-2 Neg (RdRp & N)	RNase/DNase-freies Wasser	120 µL	1	4

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung

Der SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) wird gekühlt geliefert. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -30°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(RdRp & N genes)/RP Primer/Sonden-Mix sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere darf der NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix nach der Kombination mit Primern/Sonden-Mix nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.
- Wenn das Paket, das den Satz schützt, beschädigt angekommen ist, wenden Sie sich bitte an NZYTech.
- 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), der Probentransport, die Lagerung und die Verarbeitungszeit, sind entscheidend, um optimale Ergebnisse zu erzielen. 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, RdRp and N genes (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 PCR Amplifikationsmischungen frei von Kontaminationen zu halten.

8.1 Sicherheitshinweise

Bevor Sie das Kit verwenden, lesen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf NZYTechs 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 Positivkontrolle 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. Platten sollten nach Gebrauch stets in einen geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden.
- Biologische Proben müssen 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. **Wir empfehlen dringend, die SARS-CoV-2 (RdRp & N genes)/RP-Positivkontrolle zuletzt zu pipettieren, um eine Kontamination 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 Volumen	**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 (RdRp & N) 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 (RdRp & N) anstelle des RNA-Templates in die Positivkontrollvertiefung. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
6. Bedecken und versiegeln Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Klebefilm, bevor Sie mit den Schritten RT-PCR und Detektion 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*

**Wählen Sie je nach verwendeter Ausrüstung den richtigen Erkennungskanal (FAM und JOE/VIC/HEX)*

Fluoreszierende Farbstoffe & Detektionskanäle

Gene Targets	Fluoreszierender Farbstoff	Detektionskanäle
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	JOE, VIC or HEX

NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) wurde für die folgende Real Time PCR Systems validiert: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q 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

Der Nachweis von SARS-CoV-2-RNA erfolgt durch die Detektion von zwei Ziel-Genomregionen, die beide im selben Fluoreszenzkanal (FAM™) nachgewiesen werden. Die Datenanalyse wird durch die Software des Gerätes durchgeführt. Unter Berücksichtigung von Leistungsunterschieden in verschiedenen Echtzeit-PCR-Geräten werden die Schwellenwerte für die beiden Fluoreszenzsignale (FAM™ und JOE™) automatisch von der Software bestimmt, wobei manuelle Anpassungen vorgenommen werden, falls dies erforderlich ist. 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, RdRp & N genes) und JOE™ (RP) sind positiv. Es wird erwartet, dass sich die Positivkontrolle bei einem Ct<30 verstärkt, sowohl im FAM™ als auch im JOE/VIC/HEX 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/VIC/HEX) 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≤35 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>35), 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≤35)	**+** (Ct<40)	**SARS-CoV-2 entdeckt → POSITIV**
+ (Ct≤35)	**-** (Ct>40)	**SARS-CoV-2 entdeckt → POSITIV**
- (Ct>35)	**+** (Ct<40)	**SARS-CoV-2 entdeckt → NEGATIV**
- (Ct>35)	**-** (Ct>40)	Ungültiger Test, wiederholen Sie die Extraktion und den Test

Hinweis 1: NZYTech empfiehlt eine Wiederholung der Analyse für alle Proben, die eine mehrdeutige oder atypische Kurve aufweisen, die keine eindeutige Interpretation zulässt.

Hinweis 2: Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.

• Obwohl das Risiko falsch negativer Ergebnisse aufgrund des dualen Zieldesigns des vorliegenden Tests gemildert wird, können falsch negative Ergebnisse 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 RNA SARS-CoV-2 enthalten.
- Ungeeignete Handhabung der Positivkontrolle SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N).
- Ungeeignete Handhabung des amplifizierten Produkts (Post-Amplifikations-Platte).

Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Behandlungen oder andere Entscheidungen des Patientenmanagements verwendet werden. Darüber hinaus kann dieser Test Krankheiten, die durch andere bakterielle oder virale Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.

11. Bewertung der Performance

Die Evaluierung der Performance des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kits, RdRp and N genes (IVD) wurde auf dem Applied Biosystem® 7500, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q und Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR System mit zusätzlichen Tests auf dem Applied Biosystem® 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

Typische Amplifikationsplots, die für klinische Proben mit SARS-CoV-2-Nukleinsäuren beobachtet wurden, sind in Abbildung 1 dargestellt. Die beiden Fälle stellen Beispiele für klinische Proben mit mittlerer (A) und hoher (B) SARS-CoV-2-Belastung dar. In Fällen sehr hoher SARS-CoV-2-Belastungen (siehe Abbildung 1B) kann die Kurve des Kanals JOE™, die dem menschlichen RNase P-Gen entspricht, fehlen oder eine atypische Form aufweisen.

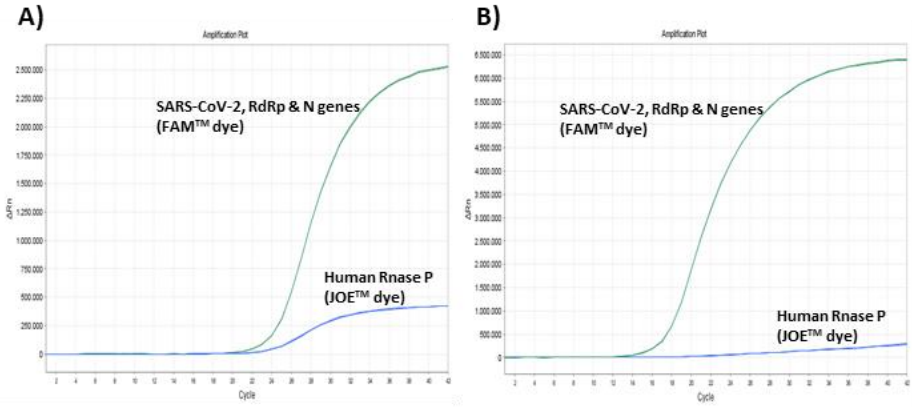

Abbildung 1. Gleichzeitiger Nachweis von SARS-CoV-2 (RdRp and N genes) und humanen RNase-P-Targets aus positiven klinischen Proben mit mittlerer (A) und hoher (B) SARS-CoV-2-Belastung. Grüne Kurven (A & B): Nachweis der viralen RNA-Targets von SARS-CoV-2 (RdRp and N genes) über den Kanal FAM™; Blaue Kurven (A & B): Nachweis des menschlichen RNase P-Gens über den Kanal JOE*. *(* VIC/HEX Alternative)*

11.2 Nachweisgrenze (LoD) - 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, einzeln oder spiked in RNA aus

negativen Oropharynx-Proben, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen nach typischen Testreaktionsbedingungen bewertet. Die Tests wurden 4 Tage lang wiederholt, wobei für jede getestete SARS-CoV-2-Konzentration 48 Replikate erzeugt wurden. Zusammen ergaben die Daten, dass das NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR-Kit, RdRp and N genes (IVD) 0,15 Kopien/µL der viralen RNA von SARS-CoV-2 mit einer Zuverlässigkeit von 95 % nachweist. So wurde die vorläufige Nachweisgrenze (LoD) auf 0,15 Kopien/µL oder 150 Kopien/mL festgelegt. Die vorläufige Nachweisgrenze wurde von zwei verschiedenen Bedienern unter Verwendung von drei Kit-Chargen in einem Experiment mit insgesamt 48 Replikaten negativer Oropharynxabstrichmatrix bestätigt, die unabhängig voneinander gespiked wurden. Die Kapazität von NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) zum Nachweis des Virus bei verschiedenen Belastungen (von 5 x 10^6 bis 5 Kopien pro Reaktion) ist in Abbildung 2 dargestellt.

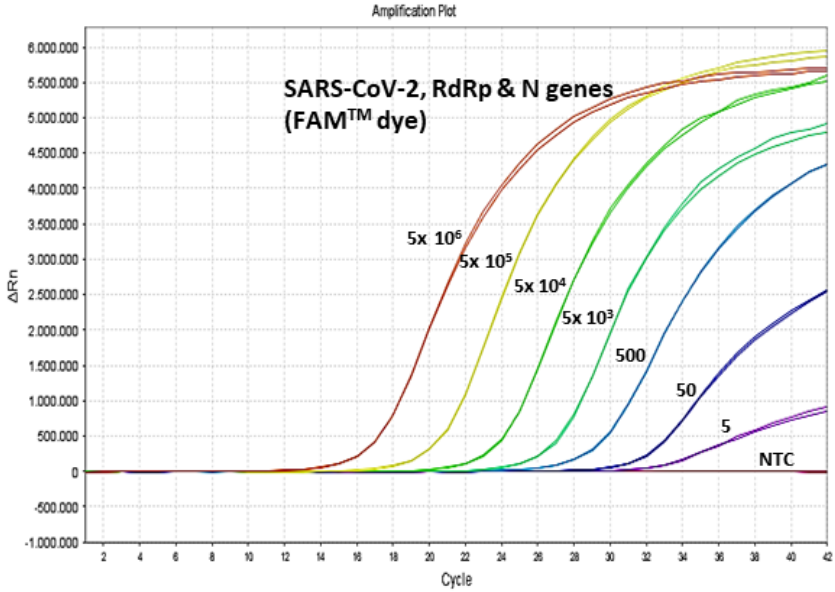

Abbildung 2. Empfindlichkeit des SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD). Amplifikationsplot (Zykluszahl gegen Fluoreszenz - ∆RN) von 1:10 serielle Verdünnungen der SARS-CoV-2 vRNA, von 5 x10^6 Kopien bis 5 Kopien pro Reaktion durch den Kanal FAM™. NTC, keine Template-Kontrolle (Negativkontrolle).

11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität

SARS-CoV-2-Target-Gene sind RdRp und N (IVD). Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden durch In-silico-Analyse von Oligonukleotidsonden und Primern gegen Pathogene, die mit SARS-CoV-2 verwandt sind, bzw. gegen normale Pathogene, die eine Infektion mit ähnlichen Symptomen verursachen, untersucht. 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 zu der *in silico* Analyse wurde SARS-CoV-2 RT-PCR an Nukleinsäuren

von häufigen Mikroben in Mund- und Atemwegen 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 mit dem vorliegenden SARS-CoV-2 RT-PCR-Test getesteten Erreger erzeugte ein nachweisbares Amplifikationssignal.

11.4 Präzision

Die Test-Präzision des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) wurde durch wiederholtes Testen von SARS-CoV-2-Nukleinsäuren bestimmt, die zwei Viruslaststufen repräsentieren: 5 (1,67x LoD) und 150 (50x LoD) Kopien pro Reaktion (0,25 und 7,50 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 durch Messung des Cq-Mittelwerts, des Cq-Variationskoeffizienten und des prozentualen Wiederholungsnachweises, wie unten für jeden Fall beschrieben, bewertet. Die Daten werden in der auf der nächsten Seite angezeigten Tabelle wiedergegeben.

11.4.1. Wiederholpräzision

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 36 Replikaten jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 72 durchgeführten Tests entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 72 Wiederholungen jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) für 5 Tage mit 18 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag (insgesamt 144 Tests) bewertet.

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Bediener durch Analyse von 144 Wiederholungen jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 48 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit

Die Bediener-Reproduzierbarkeit wurde bewertet, indem 72 Wiederholungen jeder Probe (5 und 150 Kopien pro Reaktion) von vier verschiedenen Bedienern mit 36 Wiederholungen pro Bediener getestet wurden.

Präzision des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD)

Variable getestet		SARS-CoV-2 (Kopien/Reaktion)	
		5	**150**
Wiederholpräzision			
	n	36	36
	Mittlerer Cq	31,72	26,30
	Variationskoeffizient (%)	1,94	1,60
	% Replikat-Erkennung	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit			
	n	72	72
	Mittlerer Cq	31,42	26,13
	Variationskoeffizient (%)	1,50	1,55
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge			
	n	144	144
	Mittlerer Cq	31,49	26,24
	Variationskoeffizient (%)	1,61	1,46
	% Replikat-Erkennung	100	100
Operator-Reproduzierbarkeit			
	n	72	72
	Mittlerer Cq	31,45	26,21
	Variationskoeffizient (%)	1,41	1,61
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten			
	n	72	72
	Mittlerer Cq	31,81	26,46
	Variationskoeffizient (%)	1,61	1,35
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten

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

11.5 Klinische Bewertung

Die Leistung des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kits, RdRp- und N-Gene (IVD), mit gesammelten Nasen-Rachen-Abstrichproben, wurde von zwei externen Labors bewertet. Insgesamt wurden 180 klinisch negative und 180 klinisch positive Proben getestet. Die Daten zeigten, dass für alle getesteten positiven und negativen Proben eine Übereinstimmung von 100 % erreicht wurde.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten von NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD) wurden nach den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Triplex-Echtzeit-PCR-System ermöglicht den Nachweis der für die Identifizierung der viralen RNA SARS-CoV-2 (RdRp and N genes) und der humanen mRNA (RNase P-Gen, RP) beschriebenen Targets. 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: Empfindlichkeit des SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N genes (IVD).

Katalognummer: MD04831

Verwendungszweck: Qualitativer SARS-CoV-2 Nachweis.

Hersteller: NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038 Lissabon

Portugal

Wir, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, den folgenden Normen und anderen normativen Dokumenten entspricht, ISO 9001:2015 konform ist, in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostikgeräte in der in die nationalen Gesetze der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzten Fassung.

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

Joana Brás, PhD

Technische Direktorin

17. Referenzen

WER: Klinisches Management der Severe Acute Respiratory Infection (SARI), wenn COVID-19 vermutet wird. 13. März 2020 Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Q&A: Influenza und COVID-19 - Gemeinsamkeiten und Unterschiede. 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