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

SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp und N gene, IVD

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

REF MD04871, 96 Reaktionen
MD04872, 4 x 96 Reaktionen

***Nur für den professionellen* In vitro *diagnostischen Gebrauch*.**

CE IVD

DE

Gebrauchsanweisung

IM-004de

VERSION 15/2022, Dezember 2022

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
9. Prüfverfahren 7
   - 9.1 Reaktionseinrichtung 8
   - 9.2 Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments 8
10. Datenanalyse 10
   - 10.1 Kriterien für die Laufvalidierung 10
   - 10.2 Interpretation der Testergebnisse 10
11. Bewertung der Performance 12
   - 11.1 Erwartete Ergebnisse 12
   - 11.2 Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität 12
   - 11.3 Inklusivität, Kreuzreaktivität und interferierende Substanzen 13
   - 11.4 Präzision 14
   - 11.5 Klinische Bewertung 16
12. Qualitätskontrolle 16
13. Technischer Support 16
14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse 16
15. Erläuterung der Symbole 17
16. Konformitätserklärung 18
17. Referenzen 19

1. Einführung

Das Coronavirus 2 des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms (SARS-CoV-2), früher als 2019-nCoV bezeichnet, ist der Erreger der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) und gehört wie das eng verwandte SARS-Coronavirus zur Gattung *Betacoronavirus* innerhalb der Familie der Coronaviren. Coronaviren sind behüllte, positive, einzelsträngige große RNA-Viren, die den Menschen, aber auch eine Vielzahl von Tieren infizieren. SARS-CoV-2, von dem man annimmt, dass es zoonotischen Ursprungs ist, ist hochgradig ansteckend und wird hauptsächlich durch Tröpfcheninfektion der Atemwege (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. Obwohl derzeit bereits Impfstoffe zur Bekämpfung von COVID-19 zur Verfügung stehen, verhindern sie die Infektion in geimpften Populationen nicht.

2. Verwendungszweck

NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp und N-Gene, IVD, ist eine Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) für den schnellen qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2-Nukleinsäuren in nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichproben, die von Personen mit Verdacht auf COVID-19 entnommen wurden. 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-qPCR Kit II, 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 Gene des SARS-CoV-2-Genoms ab, um die höchste Nachweisempfindlichkeit zu erzielen. Die Primer und Sonden des SARS-CoV-2-Kits weisen eine 100%-ige Homologie mit > 95% der > 5M Genomsequenzen auf, die in der GISAID-Datenbank verfügbar sind (Stand November 2021), einschließlich vollständiger Identität mit den Varianten

Delta (B.1.617.2) und Omicron (B.1.1.529). 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 Gene und humane RNase P (RP)) 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.

Die einstufige RT-qPCR ist nach wie vor die zuverlässigste und empfindlichste Methode für den genauen Nachweis von SARS-CoV-2 RNA, die auf eine Infektion des Menschen hinweist. Die aus infizierten Proben isolierte und gereinigte virale RNA wird in cDNA retranskribiert und anschließend in einer einzigen Reaktion mit zwei hochspezifischen Primer/Sonde Set nach dem so genannten TaqMan®-Prinzip amplifiziert. Während dieses Prozesses binden die Sonden spezifisch an zwei Regionen des SARS-CoV-2-Genoms, nämlich an RdRp (innerhalb des Orf1ab Polyprotein-Gens) und an N-Gene. Ein zusätzliches Primer/Sonde Set dient als endogene interne Kontrolle zum Nachweis von Nukleinsäuren des humanen RP Gens, um die Probenqualität zu beurteilen. Um die Amplifikation der drei spezifischen Ziele in einer einzigen Reaktion identifizieren zu können, sind die SARS-CoV-2 RdRp- und N-Gene und die humanen RP-spezifischen Sonden unterschiedlich markiert, nämlich mit HEX™, FAM™ bzw. Cy5™ Reporterfarbstoffen. Beachten Sie, dass diese Tafel einen Duplex-Assay in zwei verschiedenen optischen Kanälen, HEX™ (alternativ VIC™ oder JOE™) und FAM™, enthält, um die Leistung der beiden SARS-CoV-2-Verstärkungen zu erfassen. Darüber hinaus werden Primer und Sonden in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, um sicherzustellen, dass die Amplifikation von humaner mRNA, auch wenn sie in sehr hohen Konzentrationen vorliegt, die Effizienz der SARS-CoV-2 Primer/Sonde-Sets nicht einschränkt.

4. Zusammensetzung des Kits

Das NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp und N-Gene, IVD, bietet einen umfassenden Satz von Reagenzien und Kontrollen für den qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2 in einem einzigen Schritt.

Bestandteile des Kits		Volumen (pro Fläschchen)	Anzahl der Fläschchen	
			MD04871	MD04872
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix, ROX*	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	SARS-CoV-2/RP Primer/Probe Mix II (HEX™, FAM™ und Cy5™ gekennzeichnet)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (RdRp & N genes)/RP Positive-Kontrolle (1 x 10^4 Kopien/µL)	105 µL	1	4
NTC	No-Template Kontrolle	105 µL	1	4

** Obwohl die meisten Echtzeit-PCR-Geräte, die ROX-Farbstoff lesen, den Benutzern die Durchführung von Experimenten und die Analyse von Daten ohne ROX ermöglichen, verhindert die Einbeziehung dieses internen passiven Referenzfarbstoffs die Fehlinterpretation von Daten und ermöglicht die Erkennung und Diagnose von Fehlern.*

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung

Der SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes (IVD) wird gekühlt geliefert. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85°C bis -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. Beachten Sie auch die folgenden Hinweise:

- 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/Sonde Mix sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Setzen Sie insbesondere die SARS-CoV-2 MMix II ROX (RdRp & N) nach der Kombination mit der Primer/Sonde Mix nicht direktem Sonnenlicht aus.
- 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

- Echtzeit-PCR-Instrument zum Nachweis von FAM™, HEX™/JOE™/VIC© und Cy5™ Fluoreszenzfarbstoffen (bei Emissionswellenlängen von 520, 556/555/554 bzw. 670 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 sollten bei niedrigen Temperaturen gemäß den Vorschriften zur biologischen Sicherheit zu transportiert und gelagert werden. RNA oder Gesamtnukleinsäuren, die nach einem IVD-Protokoll extrahiert wurden, sind das Ausgangsmaterial für den NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, 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 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 RP Primer/Sonde-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 durchgeführt 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 immer das NTC-Röhrchen, um die Kontrollreaktion ohne Vorlage vorzubereiten.
- 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-qPCR-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 POS (RdRp & N) zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen 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 II, ROX (RdRp & N)(**)	10	*n* x 10,5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	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 No-Template bzw. Positivkontrollen hinzu.
(**) Bitte beachten Sie, dass am Boden des Master-Mix-Röhrchens ein Präzipitat beobachtet werden kann. Nachdem der Mastermix aufgetaut wurde, muss er vor der Verwendung resuspendiert werden. In diesem Fall darf der Mastermix vor dem Pipettieren nicht zentrifugiert werden.

2. Pipettieren Sie 12 µL des RT-PCR-Mixes in die einzelnen Vertiefungen entsprechend Ihrem Real-Time PCR-Experimentierplatten-Setup.

3. Für die No-Template Kontrolle geben Sie 8 µL NTC anstelle der RNA-Vorlage in die No-Template-Kontrollvertiefung. 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 folgenden Tabellen zeigen zwei optimierte thermische Protokolle (standard und schnell) zur Durchführung von SARS-CoV-2/RP-Tests mit SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp- und N-Gene, IVD, auf den unten genannten Geräten.

- **Standardprotokoll**

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 verwendetem Gerät den richtigen Detektionskanal. Sammeln Sie Signale (FAM, HEX/JOE/VIC und Cy5).*

Das Standardprotokoll für NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp- und N-Gene, IVD, wurde für die folgenden Real-Time-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro und Bio-Rad® CFX96™. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit vom Benutzer validiert werden, indem zuvor charakterisierte Proben (sowohl positive als auch negative) verwendet werden.

- **Schnelles Protokoll**

Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	50 °C	10 min	Umgekehrte Transkription
1	95 °C	1 min	Polymerase-Aktivierung
40	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	20 s	Glühen/Erweiterung *

** Wählen Sie je nach verwendetem Gerät den richtigen Detektionskanal. Sammeln Sie Signale (FAM, HEX/JOE/VIC und Cy5).*

Das schnelle Protokoll für NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp- und N-Gene, IVD, wurde für die folgenden Real-Time-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystem® QuantStudio 5 und Bio-Rad® CFX96™. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit vom Benutzer validiert werden, indem zuvor charakterisierte Proben (sowohl positive als auch negative) verwendet werden.

Die in diesem Kit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die entsprechenden Detektionskanäle sind:

Ziele	Fluoreszenzfarbstoffe**	Erkennungskanal
SARS-CoV-2, RdRp Gen	HEX™	JOE, VIC oder HEX
SARS-CoV-2, N Gen	FAM™	FAM
RNase P	Cy5™	Cy5

*** Das Öffnen des ROX-Kanals ermöglicht die Verwendung dieses internen passiven Referenzfarbstoffs, um Fehlinterpretationen und Folgefehler zu vermeiden.*

10. Datenanalyse

10.1 Kriterien für die Laufvalidierung

Der Nachweis von SARS-CoV-2 RNA erfolgt durch den Nachweis von zwei viralen Genomregionen, die in verschiedenen Fluoreszenzkanälen (FAM™ and HEX™) nachgewiesen werden, und der menschlichen RP-Kontrolle in einem dritten Kanal (Cy5™). Die Datenanalyse wird durch die Software des Gerätes durchgeführt. Unter Berücksichtigung von Leistungsunterschieden in verschiedenen Echtzeit-PCR-Geräten werden die Schwellenwerte für die drei Fluoreszenzsignale (AM™, HEX™ und Cy5™) 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 HEX™ (für SARS-CoV-2 RdRp-Gen), FAM™ (für SARS-CoV-2 N-Gen) und Cy5™ (für RP-Gen) sind positiv. Es wird erwartet, dass die Positivkontrolle bei einem Ct < 30 sowohl in den Kanälen FAM, HEX/JOE/VIC und Cy5 amplifiziert. Die Nichterfüllung dieses Qualitätskontrollkriteriums ist ein starker Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Negativkontrolle (NTC): Es wird keine Amplifikation festgestellt. Wenn die Negativkontrolle eine, zwei oder drei Amplifikationskurven (HEX™, FAM™ und/oder Cy5™) mit einer sigmoidalen Form aufweist, kann eine Probenkontamination stattgefunden haben. 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 wird erkannt**, wenn sowohl die HEX™ als auch die FAM™ Amplifikationskurven eine sigmoide Form mit einem Ct ≤ 36 aufweisen, unabhängig von dem für den RP (Cy5™) Assay erzielten Ergebnis.
- **SARS-CoV-2 wird nicht erkannt**, wenn sowohl die HEX™ als auch die FAM™ Amplifikationskurve nicht positiv sind (Ct > 36) , während der RP (Cy5™) eine positive Sigmoidalkurve (Ct < 40) aufweist.
- **Der Test ist für SARS-CoV-2 nicht schlüssig**, wenn entweder die HEX™ als auch die FAM™ Amplifikationskurven keine sigmoidale Form mit einem Ct = 36 aufweisen, während das andere SARS-CoV-2-Target positiv ist, unabhängig vom Ergebnis des RP

(Cy5™) Tests. Der Test sollte mit wieder gereinigter Nukleinsäure aus der Probe wiederholt werden.

- **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 RdRp Gen, Ct (HEX™)	**SARS-CoV-2 Ergebnis** SARS-CoV-2 N Gen, Ct (FAM™)	**RP Ergebnis** RP Gen, Ct (Cy5™)	**Interpretation der Ergebnisse**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤36)	+/-	**SARS-CoV-2 erkannt → POSITIV**
+ (Ct≤36)	- (Ct>36)	+/-	**SARS-CoV-2 nur für ein Target erkannt → UNSCHLÜSSIG**
- (Ct>36)	+ (Ct≤36)	+/-	**SARS-CoV-2 nur für ein Target erkannt → UNSCHLÜSSIG**
- (Ct>36)	- (Ct36)	+ (Ct<40)	**SARS-CoV-2 nicht erkannt → NEGATIV**
- (Ct>36)	- (Ct>36)	- (Ct>40)	**Ungültiger Test, Extraktion wiederholen und erneut testen**

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 Bewertung der Leistung des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp und N-Gene, IVD, wurde mit dem Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro und Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Geräten, unter Verwendung des oben beschriebenen Standardprotokolls, 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 Fälle sind Beispiele für klinische Proben mit hoher (Panel A) oder mittlerer (Panel B) SARS-CoV-2 Last. In Fällen sehr hoher SARS-CoV-2 Last (siehe Abbildung 1B) kann die Kurve des HEX™ Kanals, die dem menschlichen RNase P-Gen entspricht, fehlen oder eine atypische Form aufweisen (Abb. 1A).

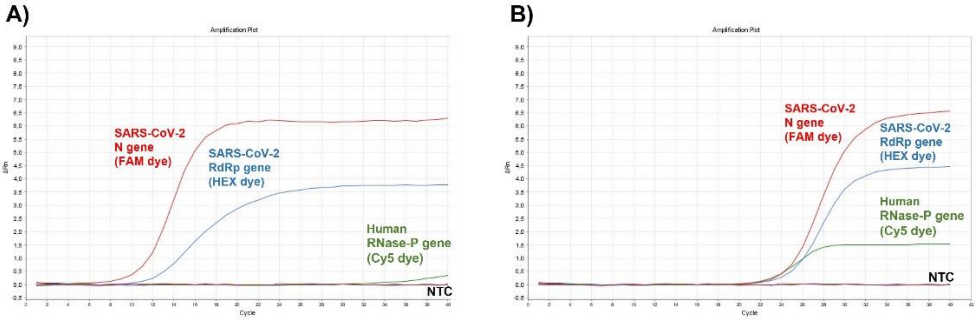

Abbildung 1. Gleichzeitiger Nachweis von SARS-CoV-2 (RdRp und N Gene) und humanen RNase-P-Targets aus positiven klinischen Proben mit mittlerer (A) und mittlerer (B) SARS-CoV-2 Last. Rote Kurve: Nachweis des SARS-CoV-2 vRNA Target (N-Gen) über den FAM-Kanal; **Blaue Kurve**: Nachweis des SARS-CoV-2 vRNA Target (RdRp-Gen) über den HEX-Kanal (*VIC/JOE Alternativen*); **Grüne Kurve**: Nachweis des humanen RNase-P-Gens durch den Kanal JOE™.

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, spiked in RNA aus negativen Oropharynx-Proben, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen nach typischen Testreaktionsbedingungen bewertet. Die Tests wurden 3 Tage lang wiederholt, wobei für jede getestete SARS-CoV-2-Konzentration 96 Replikate erzeugt wurden. Zusammen ergaben die

Daten, dass das NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR-Kit II, RdRp and N genes (IVD) 0,25 Kopien/µl oder 250 Kopien/ml der viralen RNA von SARS-CoV-2 mit einer Zuverlässigkeit von 95 % nachweist, wenn das Standardprotokoll verwendet wird. 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. Dieselbe LoD wurde für das schnelle Protokoll bestätigt.

11.3 Inklusivität, Kreuzreaktivität und interferierende Substanzen

Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden durch *In silico* Analyse von Oligonukleotid-Sonden und Primern gegen Erreger, die mit SARS-CoV-2, Influenza A und Influenza B verwandt sind, bzw. gegen normale Erreger, die Infektionen 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.

Es wurde eine *In vitro* Analyse auf Kreuzreaktivität (Exklusivität) durchgeführt, um zu bestätigen, dass NZYTech SARS-CoV-2 Einschritt-RT-PCR-Kit II, RdRp- und N-Gene, IVD, nicht mit anderen humanen kolonisierenden Mikroben und Pathogenen reagiert, die üblicherweise in klinischen Proben vorkommen. Für diese Studie wurden drei kommerzielle Atemwegserreger-Panels von ZeptoMetrix verwendet, insbesondere RP Multimarker Controls (#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) und NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Diese Panels umfassen Probenpollen, die für echte klinische Humanproben repräsentativ sind, darunter Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY02/2009), Rhinovirus Typ 1A, Adenovirus Typ 3; Parainfluenza Typ 1, Parainfluenza Typ 2, Parainfluenza Typ 3, Parainfluenza Typ 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Typ A1), Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H1N1 (A/Singapur/63/04), Influenza B (B/Florida/02/06), Respiratorisches Synzytialvirus A, Respiratorisches Synzytialvirus B (CH93 (18)-18), Coronavirus (HKU-1 rekombinant), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), *Bordetella. pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) und Humanes Bocavirus. Alle Tests wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Darüber hinaus wurden andere gängige Mikroben des Mund- und Atemtrakts, darunter wurden *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 und Streptomyces albidoflavus* ebenfalls getestet. Die mit drei verschiedenen Kit-Chargen gesammelten Daten bestätigten, dass keiner der getesteten Organismen die Leistung des NZYTech SARS-CoV-2 Ein-Schritt-RT-PCR-Kits II beeinträchtigte, indem er falsch positive Ergebnisse oder ein unspezifisches Signal erzeugte.

Die Auswirkungen von 17 potenziellen Störsubstanzen wurden in Tests bewertet, die aus negativen Nasopharyngealproben bestanden, die mit SARS-CoV-2 positiven Proben bei ~3x LoD aufgestockt wurden. Potenzielle Störsubstanzen wurden den künstlichen Proben in Konzentrationen zugesetzt, die den höchsten Konzentrationen entsprechen, die aufgrund von Literaturdaten in Proben von Patienten mit Atemwegserkrankungen zu erwarten sind. Alle Tests

wurden in fünffacher Ausfertigung durchgeführt und die Ergebnisse mit den Daten eines Kontrolltests verglichen, der keine Störsubstanzen enthielt. Bei den getesteten Konzentrationen zeigten die Ergebnisse, dass keines der getesteten Moleküle die Empfindlichkeit des Nachweises beeinträchtigte. Die nachstehende Tabelle fasst die im Rahmen dieser Experimente gesammelten Daten zusammen. Alle Experimente wurden mit dem 7500 FAST Real-time PCR Instrument durchgeführt.

Potenzielle Interferenzen	Wirkstoff	Endkonzentration in Probe	Interferenz Ja (J) oder Nein (N)
Isotonisches Meerwasser (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Rachenspray, orales Anästhetikum und Schmerzmittel (Strepfen)	Flurbiprofen	5% v/v	N
Nasenspüllösung (Allergiespray - Vibrocil)	Fluticasonpropionat	5% v/v	N
Nasenspray mit Kortikosteroiden (Nasomet)	Mometasonfuroat	5% v/v	N
Nasenspray mit Kortikosteroiden (Pulmicort)	Budesonid	5% v/v	N
Antimikrobiell, systemisch (Trobex)	Trobamycin	10 µg/mL	N
Mundschmerzmittel, entzündungshemmend und antiseptisch (Pyralvex)	Rhabard-Extrakt, Salicylsäure	5% v/v	N
Antimykotisches und antibakterielles oralpharyngeales Gel (Daktarin)	Miconazol	5 mg/mL	N
Mundspüllösung Antiseptika (Eludril Gé)	Chlorhexidingluconat, Chlorbutanol-Halbhydrat	5% v/v	N
Antitussivum, Sirup (Codipront)	Codein, Phenyltoloxamincitrat	5% v/v	N
Vollblut (Mensch)	-	4% v/v	N
Antivirales Medikament (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mukolytisch (Mucolsovan)	Ambroxolhydrochlorid	5% v/v	N
Nasentropfenlösung (Nasarox)	Oxymetazolinchlorhydrat	10% v/v	N
Antibiotika, Nasensalbe (Bactroban)	Mupirocin	5 mg/mL	N
Speichel (Mensch)	-	25% v/v	N
Absolutes Ethanol	Alkohol	5% v/v	N

11.4 Präzision

Die Test-Präzision des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes (IVD) wurde durch wiederholtes Testen von SARS-CoV-2-Nukleinsäuren bestimmt, die zwei Viruslaststufen repräsentieren: 15 (3x LoD) und 150 (30x LoD) Kopien pro Reaktion (0,75 und 7,50 Kopien/µL), spiked in RNA aus negativen Oropharynx-Proben, 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 unten angezeigten Tabelle wiedergegeben.

11.4.1. Wiederholpräzision

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 12 Replikaten jeder Probe (15 und 150 Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 24 durchgeführten Tests entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 48 Wiederholungen jeder Probe (15 und 150 Kopien pro Reaktion) für 5 Tage mit 12 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag (insgesamt 120 Tests) bewertet.

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Bediener durch Analyse von 60 Wiederholungen jeder Probe (15 und 150 Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 20 Wiederholungen pro Charge bewertet.

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

Variable getestet		RdRp-Gen (Kopien/Reaktion)		N-Gen (Kopien/Reaktion)	
		15	**150**	**15**	**150**
Wiederholpräzision					
	n	12	12	12	12
	Mittlerer Cq	31,67	28,46	31,59	28,36
	Variationskoeffizient (%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% Replikat-Erkennung	100	100	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit	n	48	48	48	48
	Mittlerer Cq	32,26	28,89	32,30	28,89
	Variationskoeffizient (%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% Replikat-Erkennung	98	100	98	100
Los-zu-Los Reproduzierbarkeit	n	60	60	60	60
	Mittlerer Cq	32,14	28,81	32,16	28,78
	Variationskoeffizient (%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% Replikat-Erkennung	98	100	98	100
Bediener Reproduzierbarkeit	n	36	36	36	36
	Mittlerer Cq	31,59	28,37	31,71	28,47
	Variationskoeffizient (%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% Replikat-Erkennung	100	100	100	100
Zwischen Instrumenten Reproduzierbarkeit	n	36	36	36	36
	Mittlerer Cq	31,74	28,53	32,31	29,21
	Variationskoeffizient (%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% Replikat-Erkennung	100	100	100	100

11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit

Die Bediener-Reproduzierbarkeit wurde bewertet, indem 36 Wiederholungen jeder Probe (15 und 150 Kopien pro Reaktion) von drei verschiedenen Bedienern mit 12 Wiederholungen pro Bediener getestet wurden.

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Geräten wurde von einem Bediener durch Testen von 36 Wiederholungen jeder Probe (15 und 150 Kopien pro Reaktion) in drei verschiedenen qPCR-

Geräten (Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5 und Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Systems) in insgesamt 72 Tests pro Probe gemessen.

11.5 Klinische Bewertung

Die Leistung des NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp- und N-Gene, IVD, unter Verwendung des Standardprotokolls mit gesammelten Nasen-Rachen-Abstrichproben, wurde von zwei externen Laboratorien bewertet. Insgesamt wurden 240 klinisch negative und 130 klinisch positive Proben getestet. Die Daten zeigten, dass für alle getesteten positiven und negativen Proben eine 100%-ige Übereinstimmung erzielt wurde. Das Schnellprotokoll wurde auch mit nasopharyngealen positiven und negativen Abstrichproben validiert. Die Daten zeigten, dass für alle getesteten klinischen Proben eine 100%-ige Übereinstimmung erzielt wurde.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten von NZYTech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, 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, HEX/JOE/VIC und Cy5 entsprechend den jeweiligen Primer/Sonde-Sets Reporterfarbstoffen beobachtet.

13. Technischer Support

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte telefonisch an unser engagiertes technisches Support-Team: Tel.: +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		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperaturgrenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer/Probe Mix)
CONTROL –	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Katalognummer: MD04871 und MD04872

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 und ISO 13485:2016 konform ist, in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 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, 1649038 Lissabon, Portugal.

Joana Brás, PhD

Technischer Direktor

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

WER: 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