

# DIRECT SARS-COV-2 REALTIME PCR KIT

REF

RTPCR002



96



Für die *In-vitro*-Diagnostik

## ZWECKBESTIMMUNG

Echtzeit-RT-PCR-Kit zum Nachweis von Nukleinsäure von SARS-CoV-2 in menschlichen Atemwegsproben und Speichel.

Bei diesem Test handelt es sich um einen automatischen, qualitativen Test zur Diagnosehilfe.

## EINLEITUNG

Coronaviren (CoV) sind lange behüllte RNA-Viren mit positiver Polarität. SARS-CoV-2 (schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2) wurde als Ursache der zuerst in Wuhan (China) im Dezember 2019 festgestellten Atemwegserkrankung identifiziert. Coronaviren sind eine große Virenfamilie, und sie treten häufig bei vielen verschiedenen Tierarten auf. Selten können tierische Coronaviren Menschen infizieren und sich derart weiterverbreiten wie MERS, SARS und SARS-CoV-2. Die von SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit nennt sich Covid-19 – Coronavirus-Krankheit 2019 – und steht in Verbindung mit Infektionen des unteren Respirationstraktes. Patienten mit SARS-CoV-2 schilderten Symptome einer milden bis schweren Atemwegserkrankung einschließlich Fieber, Husten und Schwierigkeiten beim Atmen. Am 11. März 2020 erklärte die WHO die Krankheit SARS-CoV-2 zur Pandemie.

## PRÜFGRUNDSATZ

Die Methode basiert auf der reversen Transkription (RT) und Amplifikation/Vervielfältigung eines spezifischen Fragments von SARS-CoV-2 (2019-nCoV) und SARS-verwandten Coronaviren durch Echtzeit-PCR.

Ein lyophilisierter Mastermix steht für das Screening und zur Bestätigung zur Verfügung. Die Tests kreuzreagieren nicht mit allgemein bekannten menschlichen CoV der Atemwege oder MERS.

Der PCR-Mix zielt ab auf ein spezifisches Fragment des *N*-Gens bei SARS-CoV-2 und ein generisches Fragment des *E*-Gens, das bei SARS-CoV-2 und auch bei anderen SARS-verwandten Coronaviren positiv ist.

Zur Durchführung in Verbindung mit der Extraktion der Probe (menschliches *RNAse P*-Gen) ist eine Amplifikationskontrolle enthalten, um zu überprüfen, dass kein Übertrag von Amplifikationsinhibitoren vorhanden ist und die reverse Transkription und Amplifikation korrekt erfolgt.

Die Methode gliedert sich in 2 wesentliche Schritte: RNA-Extraktion und reverse Transkription und Amplifikation/Nachweis durch spezifische Oligopare und Sonden. Coronavirus-RNA wird im FAM-Kanal (N) und im Cy5-Kanal (E) detektiert, während die interne Kontrolle mit HEX/VIC (menschliche *RNAse P*) markiert wird.

## EIGENSCHAFTEN DES KITS

VIRCELL RT-PCR MIX und VIRCELL POSITIVE CONTROL sind lyophilisiert. Sie müssen vor dem Gebrauch erst rekonstituiert werden (siehe „Produktvorbehandlung“). Die restlichen Reagenzien sind schon gebrauchsfertig. Dieser Kit basiert auf der reversen Transkription, Amplifikation und dem Nachweis durch Echtzeit-PCR.

Der Mix zielt auf konservierte Regionen ab, wenn man jedoch die Variabilität von RNA-Viren berücksichtigt, sollte ein Ergebnis nur als SARS-CoV-2 positiv bewertet werden, wenn beide Zielgene positiv sind.

## MITGELIEFERTE MATERIALIEN

[1] VIRCELL COV-2 RT-PCR MIX: 6 Fläschchen mit reverser Transkriptase, Taq-Polymerase, Puffer und spezifischen Primern/Sonde für *N*-Gen von nCoV und für *E*-Gen von SARS-verwandten Coronaviren. Ebenso, als interne Kontrolle, Primer/Sonde für menschliches *RNAse P*-Gen. 16 Reaktionen pro Fläschchen. Lyophilisiert.

[3] VIRCELL COV-2 POSITIVE CONTROL: 1 Fläschchen mit einem Gemisch aus lyophilisierten nicht infektiösen Nukleinsäuren zur Verwendung als Positivkontrolle. Roter Verschluss.

[4] VIRCELL NEGATIVE CONTROL: 200 µl entionisiertem Wasser für den Gebrauch als Negativkontrolle. Grüner Verschluss.

[5] VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION: 2 x 1 ml wässriger Lösung für die Herstellung der PCR-Mischung. Gelber Verschluss.

[6] VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 µl wässriger Lösung zur Herstellung der Positivkontrolle. Brauner Verschluss.

## Spezielle Materialien, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden:

- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank.
- DNA/RNA-Extraktions-Kit (siehe Empfehlungen unter „Testverfahren“).
- Real Time PCR Thermocycler.
- Präzisions-Mikropipetten.
- Sterile Spitzen mit Aerosolbarriere.
- Mikrozentrifuge.
- PCR-Kabine (empfohlen).
- Vortex.

## LAGERUNGS- UND HANDHABUNGSBEDINGUNGEN

Bei 2-8°C lagern. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums einsetzen. Das Verfallsdatum der Reagenzien ist nur gültig bei Lagerung in gut verschlossenem Zustand bei 2-8°C.

## HALTBARKEIT NACH ANBRUCH

VIRCELL POSITIVE CONTROL rekonstituierte: bei Temperaturen -25 bis -15 °C lagern und vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

VIRCELL RT-PCR MIX rekonstituierte: bei Temperaturen -25 bis -15 °C lagern und vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Restliche Reagenzien: Siehe Verfallsdatum auf der Packung (bei 2-8°C).

VIRCELL RT-PCR MIX sollten unmittelbar nach der Rekonstitution verwendet und in einem vor Licht geschützten Kühlrack aufbewahrt werden.

VIRCELL, S.L. haftet nicht für die unsachgemäße Verwendung der im Kit enthaltenen Reagenzien.

## WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Das Produkt sollte auf Personal begrenzt werden, das in der Technik geschult wurde.
3. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig.
4. Verwenden Sie nur die in dieser Broschüre beschriebenen Protokolle. Wenn die Bedingungen nicht den Angaben entsprechen, sind die Ergebnisse möglicherweise falsch.
5. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien persönliche Schutzausrüstung. Waschen Sie Ihre Hände beim Umgang mit Proben und Reagenzien gründlich. Alle Verfahren müssen in Übereinstimmung mit den genehmigten Sicherheitsstandards durchgeführt werden.
6. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
7. Nicht mit dem Mund pipettieren.
8. Keine beschädigten Kits verwenden.
9. Verwenden Sie das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr.
10. Lassen Sie die Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich auf einer anderen Temperatur als empfohlen.
11. Halten Sie Behälter für Proben und Reagenzien geschlossen, wenn diese nicht bearbeitet werden.
12. Vermeiden Sie die Verwendung von Proben, die wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt sind.
13. Verwenden unter aseptischen Bedingungen, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
14. Die Komponenten dieses Geräts können genetisches Material oder Substanzen tierischen und/oder menschlichen Ursprungs haben. Auch wenn dieses Material nicht infektiös ist, muss es als potenziell infektiös behandelt werden. Das gesamte Material muss als potenziell infektiös gehandhabt und entsorgt werden. Beachten Sie die lokalen Bestimmungen für Abfälle.
15. Jedes nicht verwendete Material muss gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
16. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur VIRCELL NEGATIVE CONTROL, VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION und VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION sind mit entsprechenden, weiteren RTPCR VIRCELL-Referenzen und -Artikeln kompatibel.
17. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.
18. Die Proben müssen gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien so behandelt werden, als wären sie infektiös, gemäß den Sicherheitsverfahren in

Laboratorien. Halten Sie alle Arbeitsflächen mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5% Natriumhypochlorit in entionisiertem oder destilliertem Wasser sauber und steril.

19. Um zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, ist es ratsam, die Proben so früh wie möglich nach deren Gewinnung zu testen. Es sind keine Untersuchungen über die Auswirkungen der Transportzeit durchgeführt worden.

20. Für die Durchführung des Tests ist es notwendig, über voneinander getrennte Arbeitsbereiche zu verfügen: einen Bereich vor der Amplifikation und einen Bereich für die Amplifikation.

21. Wegen der hohen analytischen Sensitivität des Tests müssen die Vorsichtsmaßnahmen verschärft werden, um die Reinheit der Reagenzien des Kits und der Amplifikationsmischungen zu gewährleisten. Alle verwendeten Reagenzien müssen den höchsten Reinheitsgrad aufweisen.

22. Es wird empfohlen, konventionelle RNA-Reinigungskits zu verwenden.

23. Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretenden schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

#### BEDINGUNGEN FÜR DIE ENTNAHME, BEHANDLUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBE


Die am häufigsten verwendeten Proben sind nasopharyngeale/oropharyngeale Abstriche und Speichel.

Verzögern Sie weder den Transport noch Laboruntersuchungen. Die Proben könnten bei 2 bis 8 °C bis zu 72 Stunden nach der Entnahme gelagert werden. Wenn eine Verzögerung zu erwarten ist, wird eine Lagerung bei -90 bis -70 °C empfohlen.

#### PRODUKTVORBEHANDLUNG

Alle gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig, außer VIRCELL RT-PCR MIX [1] und VIRCELL POSITIVE CONTROL [3].

[1] VIRCELL RT-PCR MIX. Fügen Sie für die Rekonstitution pro Fläschchen 240 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu. Mischen Sie 2-3 Sekunden lang sorgfältig mit einem Vortexmischer.

 Der rekonstituierte VIRCELL RT-PCR MIX ist direkt nach Zugabe der Rekonstitutionslösung zu verwenden und sollte bis zur Verwendung in einem vor Licht geschützten Gefrier-Rack aufbewahrt werden.

Überschüssiger rekonstituierter PCR-Mix kann bei einer Temperatur unter -25 bis -15 °C lichtgeschützt eingefroren werden, um für weitere Reaktionen verwendet zu werden.

[3] VIRCELL POSITIVE CONTROL. Führen Sie für die Rekonstitution die folgenden Schritte aus:

- Zentrifugieren Sie das entsprechende Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.
- Fügen Sie 100 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION [6] hinzu.
- Mischen Sie 1-2 Sekunden lang mit einem Vortexmischer.
- Zentrifugieren Sie das Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.

Nach der Rekonstitution kann die VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] bei Temperaturen unter -25 bis -15 °C eingefroren werden für ihren Gebrauch bei späteren Ansätzen.

#### TESTVERFAHREN

1. RNA-Extraktion (durchgeführt im Prä-Amplifikationsbereich):

KONTROLLE	N (FAM)	E (Cy5)	IC (HEX/VIC)	Interpretation
VIRCELL CoV-2 POSITIVE CONTROL	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Korrekt
	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig
VIRCELL NEGATIVE CONTROL	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder späte Amplifikation (Ct > 38)	Korrekt
	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 38)	Ungültig

#### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisinterpretation wird in den nachstehenden Tabellen dargestellt:

ERGEBNIS	N (FAM)	E (Cy5)	IC <sup>2</sup> (HEX/VIC)	Interpretation
1	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig (Probe/den Kit/Ablauf betreffend)

1.1. Es wird empfohlen, ein kommerzielles Extraktionskit für RNA-Extraktionen zu verwenden. Bei der Verwendung von kommerziellen Extraktionskits sind die Anweisungen des Herstellers zu befolgen. Kontakt zum Kundendienst.

2. Amplifikation mit RT-PCR (durchgeführt im Amplifikationsbereich):

2.1. Für jede Probe ist ein Röhrchenpaar sowie zusätzlich ein Röhrchenpaar für die Negativ- und die Positivkontrolle erforderlich. Für jede Probe ist ein Röhrchen erforderlich, sowie zusätzlich ein Röhrchen für die Negativkontrolle und ein weiteres für die Positivkontrolle.

2.2. Rekonstitution des VIRCELL RT-PCR MIX: Fügen Sie pro Fläschchen 240 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu. Mischen Sie 2-3 Sekunden sorgfältig mit einem Vortexmischer. Nach der Rekonstitution/dem Auftauen kalt halten.

2.3. Pipettieren Sie 15 µl von Mix in ein Röhrchen.

2.4. Hinzufügen der Probe: Fügen Sie jedem Röhrchen 5 µl jeder extrahierten RNA-Probe hinzu. Fügen Sie den entsprechenden Röhrchen 5 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] und VIRCELL NEGATIVE CONTROL [4] hinzu. Die Negativkontrolle ist Wasser. Befestigen Sie die Verschlüsse der Röhrchen/Röhrchenstreifen.

2.5. RT-PCR-Programm: Geben Sie die PCR-Röhrchen in den Echtzeit-Thermocycler und führen Sie das folgende Programm\* aus:

1 Zyklus	51 °C	20 Minuten
1 Zyklus	95 °C	2 Minuten
45 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	58 °C	45 Sekunden*

\* Fluoreszenzdaten (FAM, Cy5 und HEX/VIC) sollten erfasst werden.

#### INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Jede Charge wird unter Einhaltung strenger Vorgaben internen Qualitätskontrollen unterzogen, bevor sie freigegeben wird.

#### TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER

Bei jeder Testdurchführung muss eine Negativkontrolle mit eingeschlossen werden. Durch die Negativkontrolle wird die Kontamination des Reagenzes oder der Umgebung überprüft.

Es wird empfohlen, die Positivkontrolle bei jedem Durchlauf einzubeziehen. Die Positivkontrolle überprüft auf fehlerhafte Reagenzien und die korrekte Durchführung des Arbeitsvorgangs.

Die Thermocycler Software berechnet voraussichtlich automatisch den Baseline-Fluoreszenzwert (Schwellenwert) auf Grundlage der Amplifikationskurve für jedes Zielgen (Fluoreszenzdetektion). Dennoch wird empfohlen, die Schwellenwerte für die verschiedenen Detektionskanäle individuell festzulegen. Um einen Schwellenwert für jedes Zielgen festzulegen, wird empfohlen, die Amplifikationskurven der positiven und negativen Kontrollen als Referenz zu verwenden. Der Schwellenwert sollte auf den Beginn des exponentiellen Anstiegs der gemessenen Fluoreszenz und oberhalb des Hintergrundsignals festgelegt werden.

Die Ergebnisinterpretation der Kontrollen lautet wie folgt:

ERGEBNIS	N (FAM)	E (Cy5)	IC <sup>2</sup> (HEX/VIC)	Interpretation
2	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	SARS-CoV-2 Negative
3	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	SARS-CoV-2 Positiv
4	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	SARS-CoV-2 Positiv
5	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Unklar
6	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	SARS-verwandtes Coronavirus positiv – <sup>1</sup> mutmaßliches SARS-CoV-2-positives

<sup>1</sup> Ein nur für das Zielgen E positives Probenergebnis könnte als mutmaßlich SARS-CoV-2 positiv betrachtet werden, wahrscheinlich aufgrund geringer RNA, nah an der Erfassungsgrenze oder unterschiedlicher Amplifikationseffizienz bei den Zielgenen E und N. SARS-verwandte Coronaviren (andere Sarbecoviren) könnten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Probe sollte zur Bestätigung noch einmal getestet werden.

<sup>2</sup> Bei einer hohen Vervielfältigungszahl der Zielnukleinsäure kann die Amplifikation der internen Kontrolle (IC) in den Ergebnissen 3 bis 6 beeinträchtigt sein. Die Amplifikation oder eine fehlende IC-Amplifikation ändert nichts an der Interpretation des Ergebnisses.

Bei einem ungültigen oder unklaren Ergebnis wird empfohlen, die RNA-Extraktion aus der Originalprobe zu wiederholen und erneut zu testen. Bei einer fehlgeschlagenen Amplifikation der internen Kontrolle könnte von einer unsachgemäßen Extraktion von Nukleinsäuren oder nicht genügend menschlichem Zellmaterial ausgegangen werden. Es wird empfohlen, eine neue Probe zu testen.

#### VERWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN

1. Der Kit ist für die Untersuchung von humanen respiratorischen Proben und Speichel. Eine Leistungsbewertung mit anderen Probentypen wurde nicht durchgeführt.

2. Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.

3. Der Nachweis der Virusnukleinsäuren hängt von der Menge der Viruslast in der Probe ab und kann durch Probenahmeverfahren, Patientenfaktoren, das Infektionsstadium und/oder den Erregerstamm beeinträchtigt werden. Falsch negative Ergebnisse können auch entstehen, wenn Amplifikationsinhibitoren in der Probe vorhanden sind. Es sollten validierte Nukleinsäureextraktionsverfahren für RNA-Viren verwendet werden.

4. Die Ergebnisse des Tests sind qualitativer Natur. Es existiert keinerlei Korrelation zwischen der Größe des positiven Ergebniswertes und der Anzahl an Mikroorganismen in der Probe.

5. Der Test funktioniert nur innerhalb der Grenzen der genomischen Regionen, für die die Sonden ausgewählt worden sind. Der Test zielt auf stark konservierte Regionen ab, aufgrund der hohen Variabilität der RNA Genome, ist es möglich, dass bestimmte Subtypen nicht festgestellt werden. Zur Zeit der Entwicklung wurden keine Mutationen der Zielregionen detektiert.

6. Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein des Mikroorganismus in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze des Tests nicht aus.

7. Ein positiver Test schließt die Möglichkeit nicht aus, dass andere Pathogene vorhanden sind.

8. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

#### LEISTUNGSMERKMALE

##### SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

###### TEST 1

Nasopharyngeale/oropharyngeale Abstrichproben wurden mit einem handelsüblichen Real Time PCR-Kit untersucht oder extern charakterisiert. Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	691	
Sensitivität (%)	90	
	95% CI	85-94
Spezifität (%)	100	
	95% CI	99-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	97	
LR+/LR-	-0,91/-0,89	
Echt-positiv	164	
Echt-negativ	500	

Falsch-positiv	0
Falsch-negativ	18
Grenzfälle	9

CI: Konfidenzintervall  
 PPV: Positiver prädiktiver Wert  
 NPV: Negativer prädiktiver Wert  
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis  
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

###### TEST 2

Speichelproben wurden mit einem handelsüblichen Real Time PCR-Kit untersucht oder extern charakterisiert.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	600	
Sensitivität (%)	100	
	95% CI	85-94
Spezifität (%)	100	
	95% CI	99-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	100	
LR+/LR-	-1,01/-0,99	
Echt-positiv	96	
Echt-negativ	500	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	0	
Grenzfälle	4	

CI: Konfidenzintervall  
 PPV: Positiver prädiktiver Wert  
 NPV: Negativer prädiktiver Wert  
 LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis  
 LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

###### GENAUIGKEIT

4 Proben (2 positive und die Positiv- und Negativkontrolle) wurden zweimal in 2 Durchläufen pro Tag in 2 verschiedenen qRT-PCR-Thermocyclern an 20 aufeinanderfolgenden Tagen amplifiziert. Es wurden die Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs, die Genauigkeit zwischen den Durchläufen, die Genauigkeit zwischen den Tagen und die Genauigkeit zwischen den Labors ermittelt.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

E Zielgen

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,9	0,9	1,5	1,5
Positive Probe 1	1,9	1,2	0,7	0,7

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positive Probe 2	1,9	1,4	1,5	1,5
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

#### N Zielgen

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,5	1,1	0,2	0,2
Positive Probe 1	1,8	1,6	0,7	0,7
Positive Probe 2	1,5	1,4	1,0	1,0
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

#### KREUZREAKTIVITÄT

Die Spezifität wurde bestätigt, indem ein Panel aus verschiedenen Mikroorganismen zur Abdeckung der häufigsten Erreger von Atemwegserkrankungen getestet wurde: HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV (2003), Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza B, Rhinovirus, Enterovirus, Respiratorisches Synzytial-Virus A, Respiratorisches Synzytial-Virus B, Parainfluenzavirus 1, Parainfluenzavirus 2, Parainfluenzavirus 3, Parainfluenzavirus 4, Parechovirus, humanes Metapneumovirus, Adenovirus, *Chlamydomyxa pneumoniae*, *Chlamydomyxa psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und eine konzentrierte menschliche Nasenwaschung (zur Abdeckung der unterschiedlichen Mikrobenflora des menschlichen Respirationstraktes).

Es wurde keine Kreuzreaktivität mit diesen Erregern festgestellt.

Zusätzlich wurde eine in-silico-Analyse der Primer-/Sondensequenzen zum Vergleich mit anderen Mikroorganismen, die in einer Atemwegsprobe gefunden und Speichel werden können, durchgeführt, und zwar gemäß der WHO-Richtlinie: Instructions for Submission Requirements: *In vitro* diagnostics (IVDs) Detecting SARS-CoV-2 Nucleic Acid- Emergency Use Listing of IVDs, WHO. Die Sequenz von 8 Mikroorganismen, die in einer Atemwegsprobe gefunden und Speichel werden könnten, wurde analysiert: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, Influenza C, *Legionella non-pneumophila*, Leptospiraceae, *Neisseria elongate*, *Pneumocystis jirovecii* und *Streptococcus salivarius*. Eine Homologie von über 80 % wurde in keinem der analysierten Mikroorganismen gefunden.

#### ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

##### TEST 1

Die LOD (Limit of Detection) des SARS-CoV-2-Virus wurde unter Verwendung einer negativen nasopharyngealen Abstrichmatrix bewertet. Die virale RNA wurde unter Verwendung von OptiPure Viral Autoplate auf einem M9600-Gerät (TANBead) extrahiert.

Es wurde eine vorläufige LOD (Limit of Detection) bestimmt, indem seriellen Verdünnungen einer quantifizierten SARS-CoV-2-Virusprobe getestet wurden.

Nach dem Festlegen einer angenäherten LoD wurde die Endkonzentration bestätigt, indem 3 serielle Verdünnungen getestet wurden. Für jede Verdünnung werden mindestens 20 Replikate getestet.

Die LoD wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, in der  $\geq 95\%$  der Replikate positiv sind.

	E Zielgen	N Zielgen
LoD (kopien/ $\mu$ L)	0.8	0.8
LoD (kopien/mL)	800	800
LoD (kopien/reaktion)	4	4
LoD (IU/kopien)	0.8	0.8

##### TEST 2

Die LoD (Limit of Detection) des SARS-CoV-2-Virus wurde unter Verwendung einer negativen Speichelmatrix bewertet. Die virale RNA wurde unter Verwendung von OptiPure Viral Autoplate auf einem M9600-Gerät (TANBead) extrahiert.

Es wurde eine vorläufige LOD (Limit of Detection) bestimmt, indem seriellen Verdünnungen einer quantifizierten SARS-CoV-2-Virusprobe getestet wurden.

Nach dem Festlegen einer angenäherten LoD wurde die Endkonzentration bestätigt, indem 3 serielle Verdünnungen getestet wurden. Für jede Verdünnung werden mindestens 20 Replikate getestet.

Die LoD wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, in der  $\geq 95\%$  der Replikate positiv sind.

	E Zielgen	N Zielgen
LoD (kopien/ $\mu$ L)	1	1
LoD (kopien/mL)	1000	1000
LoD (kopien/reaktion)	5	5
LoD (IU/kopien)	1	1

##### TEST 3

Die LOD (Limit of Detection) für SARS-CoV-2 wurde bestimmt durch Testen von RNA-Kontrollen (AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL).

Es wurde eine vorläufige LOD (Limit of Detection) bestimmt, indem seriellen Verdünnungen quantifizierter RNA-Kontrollen getestet wurden.

Nach dem Festlegen einer angenäherten LoD wurde die Endkonzentration bestätigt, indem 3 serielle Verdünnungen getestet wurden. Für jede Verdünnung werden mindestens 20 Replikate getestet.

Die LoD wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, in der  $\geq 95\%$  der Replikate positiv sind.

	SARS-CoV-2
LoD (kopien/ $\mu$ L)	2
LoD (kopien/mL)	2000
LoD (kopien/reaktion)	10

#### INKLUSIVITÄT

Es wurde eine in-silico-Analyse der im Test enthaltenen analysierten Gene durchgeführt, um die Inklusivität für die verschiedenen vorhandenen SARS-CoV-2-Sequenzen zu bestimmen.

Die Kriterien für die Einbeziehung der verschiedenen Sequenzen in die Analyse waren geografische Daten und das Datum, an dem die Sequenz hinterlegt wurde. In die Analyse jedes Virus wurden verschiedene Abstammungslinien, Typen oder Subtypen einbezogen.

Der Zugriff auf die Sequenzen erfolgte über die Datenbanken der GISAID Plattform (<https://www.gisaid.org/>) und der GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass keine signifikanten Auswirkungen auf das Amplifikations-/Nachweisverfahren zu erwarten sind. Daher ist nicht davon auszugehen, dass die Reaktivität der spezifischen, im PCR Mix enthaltenen Oligonukleotide beeinflusst wird.

#### ANALYTISCHE INKLUSIVITÄT

Die analytische Inklusivität des Kits für den Nachweis von SARS-CoV-2 wurde durch Testen der folgenden RNA-Kontrollen analysiert: AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL, AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.1.7 RNA CONTROL, AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.351 RNA CONTROL, AMPLIRUN® SARS-CoV-2 P.1 RNA CONTROL, AMPLIRUN® SARS-CoV-2 DELTA (B.1.617.2) RNA CONTROL, AMPLIRUN® SARS-CoV-2 OMICRON (B.1.1.529) RNA CONTROL und eine klinische Probe für SARS-CoV-2 C.37 (Lambda), die zuvor durch Sequenzierung charakterisiert wurde.

Die Amplifikation beider Targets ist für alle getesteten SARS-CoV-2-Varianten positiv.

#### EXTERNE KONTROLLE

Die folgenden Kontrollen sind erforderlich, werden aber nicht mit dem Test-Kit geliefert:

- als positive Extraktionskontrolle, AMPLIRUN® TOTAL SARS-CoV-2 CONTROL (SWAB) Kat. MBTC030 (Vircell)

- als negative Extraktionskontrolle (NEC), RESPIRATORY SWAB MATRIX NEGATIVE CONTROL Kat. MC110 (Vircell)

Externe Kontrollen helfen bei der Kontrolle von Kreuzkontaminationen während des Extraktionsvorgangs und dienen zusätzlich als Validierungsinstrument für Extraktionsreagenzien.

### STABILITÄT: KREUZKONTAMINATION

Das Vorhandensein von Kreuzkontaminationen während des gesamten NAT-Verfahrens wurde analysiert, indem 5 Durchläufe mit 8 positiven und 8 negativen nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichproben auf das SARS-CoV-2-Virus in abwechselnden Positionen getestet wurden.

Es wurde keine Kreuzkontamination festgestellt.

### STABILITÄT: GESAMTSYSTEM-FEHLERRATE

Die Rate, die zu falsch-negativen Ergebnissen führt, wurde durch Testen von 100 negativen nasopharyngealen/oropharyngealen Abstrichproben durch Inokulation mit SARS-CoV-2 genomischer RNA bei 3 x LoD bestimmt.

Die Falsch-Negativ-Rate lag unter 1 %.

### SPEICHELPROBEN-VALIDIERUNG

40 SARS-CoV-2-positive und 31 SARS-CoV-2-negative Speichelproben, die zuvor durch einen Referenztest charakterisiert waren, der sich von den beiden in diesem Assay getesteten Kits unterscheidet, wurden parallel mit dem DIRECT SARS-CoV-2 REALTIME PCR KIT und einem kommerziellen RTPCR-Kit getestet, bei dem Speichel als gültiger Probentyp vorgesehen ist.

Eine vergleichende Analyse der Ergebnisse wurde durchgeführt. Der DIRECT SARS-CoV-2 REALTIME PCR KIT zeigte eine 100-prozentige Übereinstimmung mit dem Vergleichsgerät für die negativen Speichelproben. Für positive Proben wurde eine 95-prozentige Übereinstimmung festgestellt.

		Speichel-vergleichsgerät (predicate device)			
		Positiv	Unklar	Negativ	Gesamt
DIRECT SARS-CoV-2 REALTIME PCR KIT	Positiv	38	1	1	40
	Unklar	0	0	0	0
	Negativ	0	0	31	31
	Gesamt	38	1	32	71

### BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLE



Für die *In-vitro* Diagnostik



Verwendbar bis (Verfallsdatum)



Bei x-y°C lagern



Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen



Chargen-Nummer



Bestell-Nummer



Gebrauchsanleitung beachten



Rekonstituieren in <X> µl



Hersteller

### LITERATUR

1. Azzi, L. et al. 2020. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. J Infect, 81(1), e45-e50.
2. Berenger, B. M. et al. 2021. Saliva collected in universal transport media is an effective, simple and high-volume amenable method to detect SARS-CoV-2. Clin Microbiol Infect, 27(4), 656-657.
3. Corman, V. M. et al. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill, 25(3), 2000045.
4. Kam, K. Q. et al. 2020. A Well Infant with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) with High Viral Load. Clin Infect Dis, 71(15), 847-49.
5. Wang, W. et al. 2020. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA, 323(18), 1843-44.
6. World Health Organization. 2020. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. Interim guidance. WHO Global.

7. Wang, W.K. et al. 2004. Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. Emerg Infect Dis, 10(7), 1213-1219

8. Zhu, N. et al. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, 382(8), 727-733.

Versionsnummer: L-RTPCR002-DE-07

Datum: 2022/05/25

Vorhergehende Version: L-RTPCR002-DE-06

Aktualisierungen: siehe „Änderung in Kapitel“

Änderung in Kapitel: EINLEITUNG, SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT, GENAUIGKEIT, KREUZREAKTIVITÄT, ANALYTISCHE SENSITIVITÄT, INKLUSIVITÄT, ANALYTISCHE INKLUSIVITÄT, EXTERNE KONTROLLE, STABILITÄT: KREUZKONTAMINATION, STABILITÄT: GESAMTSYSTEM-FEHLERRATE