

COVID-19 *direct* RT-PCR δ

Zur Verwendung auf einem qPCR Gerät

In-vitro-Diagnostikum



Gebrauchsanweisung

Zweckbestimmung

Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test ist ein *In-vitro*-Echtzeit-Test auf der Grundlage der reversen Transkriptionspolymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum qualitativen Nachweis von Nukleinsäure aus SARS-CoV-2 **und der SARS-CoV-2 Delta-Virusvariante** in Proben der oberen und unteren Atemwege (z. B. nasal, nasopharyngeale oder oropharyngeale Abstriche, Sputum, Aspirate der unteren Atemwege, bronchoalveoläre Lavage und Nasenspülung/Aspirat oder Nasensauger, Mund-/Rachenspüllösung), die von Personen, bei denen der Verdacht auf COVID-19 besteht, von ihrem medizinischen Betreuer entnommen wurden.

Die Ergebnisse dienen der Identifizierung von SARS-CoV-2 RNA. Die SARS-CoV-2-RNA ist im Allgemeinen in respiratorischen Proben während der akuten Phase der Infektion nachweisbar. Positive Ergebnisse sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA; eine klinische Korrelation mit der Patientengeschichte und anderen diagnostischen Informationen ist notwendig, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Positive Ergebnisse schließen eine bakterielle Infektion oder eine Co-Infektion mit anderen Viren nicht aus. Der nachgewiesene Erreger ist möglicherweise nicht die endgültige Krankheitsursache.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen des Patientenmanagements herangezogen werden. Negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, Patientenanamnese und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.

Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test ist für die Anwendung durch geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das speziell in den Techniken der RT-PCR und in *In-vitro*-diagnostische Verfahren ausgebildet ist.

Zusammenfassung und Prüfgrundsatz

Anwendungsbereich

SARS-Coronaviren wie SARS-CoV-2 (ätiologischer Erreger der Pandemie COVID-19) verbreiten sich hauptsächlich über Tröpfchen in der Atemluft von Mensch zu Mensch. Bei Menschen mit COVID-19 wurde über ein breites Spektrum von Symptomen berichtet – von leichten Symptomen bis hin zu schweren Erkrankungen. Die Symptome können 2-14 Tage nach der Exposition gegenüber dem Virus auftreten. Symptome können Fieber, Husten und Atembeschwerden bis hin zu Lungenentzündung und akutem Atemnotsyndrom sein [1].

Erstmals im April 2021 wurde aus Indien über die zunehmende Identifizierung und Verbreitung der SARS-CoV-2 VOC (VOC: *variant of concern*) **B.1.617.2 (Delta)** berichtet [2]. B.1.617.2 zeichnet sich durch Mutationen aus, die mit einer reduzierten Wirksamkeit der Immunantwort in Verbindung gebracht werden und die die Übertragbarkeit des Virus erhöhen könnten. Eine der Mutationen der Delta-Variante ist L452R.

Erläuterung des Testprinzips

Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test dient dazu, das SARS-CoV-2 und die SARS-CoV-2 Delta-Mutation L452R direkt aus dem Tupfer oder anhand von Mund- und Rachenspüllösungen auf einem kommerziell erhältlichen qPCR Cycler nachzuweisen. Er besteht aus einem Testkit mit zwei vor Gebrauch zu mischenden Lösungen, die

in die PCR-Reaktionsgefäße bzw. Wells der Mikrotiterplatten gefüllt werden. Die gebrauchsfertigen Lösungen liegen für jeweils 96 Tests portioniert vor. Sie enthalten alle notwendigen Chemikalien (Pufferkomponenten, Substanzen für reverse Transkription und PCR inkl. real-time Sonden mit Fluoreszenzmarkierung). Nach Zugabe der unbehandelten Patientenprobe zu den PCR-Reaktionsgefäßen erfolgt die Analyse direkt im qPCR Gerät. Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test enthält Nachweissonden, die spezifisch für SARS-CoV-2 sind und Sonden für die Detektion der Untergattung Sarbecovirus, für die **Delta-Mutation L452R** sowie für eine Interne Kontrolle. Die Sonden sind jeweils mit fluoreszierenden Reporter-Farbstoffen markiert (FAM für SARS-COV-2, N-Gen; CalFluor Red 610 für Sarbecovirus, E-Gen; HEX für die Interne Kontrolle **und Atto647N für SARS-CoV-2 Delta-Mutation L452R, Spike-Gen**). Jede Sonde verfügt zudem über einen zweiten Farbstoff, der als Quencher dient und die Fluoreszenzsignale der intakten Sonden unterdrückt.

Während der PCR-Amplifikation hybridisieren die Sonden an eine spezifische Target-Sequenz, falls diese in der Probe vorhanden ist. Dies führt zur Spaltung der Sonde durch die 5'-zu-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase und damit zur Trennung der Reporter- und Quencherfarbstoffe, was wiederum zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Mit jedem PCR-Zyklus werden zunehmend mehr gespaltene Sonden erzeugt und das Signal nimmt weiter zu. Jeder Reporter-Farbstoff wird bei einer definierten Wellenlänge gemessen, was den gleichzeitigen Nachweis und die Unterscheidung verschiedener Target-Sequenzen im Coronavirus sowie der Internen Kontrolle erlaubt. Die Analyse erfolgt semi-quantitativ, indem Ct (Cycle threshold)-Werte verglichen werden. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, in dem das Signal erstmals über einen bestimmten Schwellenwert ansteigt. Je mehr Target-Kopien (hier: Virus-RNA) in der Probe vorhanden waren, desto niedriger ist der Wert.

Um sicherzustellen, dass die Patientenprobe keine RT-PCR-inhibierenden Substanzen enthält, ist jeder Reaktion eine Interne Kontrolle zugefügt. Bei dieser wird ein künstliches RNA-Target, welches keine bekannten Homologien aufweist und im selben RT-PCR-Ansatz enthalten ist, in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und detektiert. So können falsch negative Testergebnisse durch Inhibition der RT-PCR ausgeschlossen werden. Der Puffer enthält Additive zur Viruslyse, Verstärkung der PCR-Effizienz und Inhibition von RNasen. Dadurch können Patientenproben direkt und ohne vorherige RNA-Extraktion analysiert werden.

Reagenzien, Material

Packungsinhalt

Die Reagenzien je eines Vial-Sets (Lösung A δ , Lösung B δ) reichen für 96 Bestimmungen. Jedes Set enthält:

Material	REF	Menge
Lösung A δ	DNA-Polymerase, Reverse Transkriptase, Sonde für E-Gen, Sonde für N-Gen, Sonde für SARS-CoV-2 Delta-Mutation L452R, Sonde für die Interne Kontrolle, dNTPs, Additive, Reaktionspuffer (Art. Nr. FBC103)	1 x 1,6 mL/96-Kit
Lösung B δ	Additive zur Reduktion der Inhibition, Reaktionspuffer, Template der Internen Kontrolle (Art. Nr. FBC103)	1 x 18 μ L/96-Kit
Negativkontrolle	Art. Nr. FBC101-NC	1 (optional), 13 μ L/96-Kit)
Positivkontrolle	Art. Nr. FBC101-PC	1 (optional), 13 μ L/96-Kit)
Gebrauchsanweisung	--	1 (Kurzversion)

Zusätzlich benötigtes Material, Geräte und Software:

- qPCR Cycler
- Einweg-Schutzhandschuhe; puderfrei
- PCR-Reaktionsgefäße/Mikrotiterplatte plus adhäsive, optische Folie
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- Kühlblock
- Vortexer/Zentrifuge(n) optional

Haltbarkeitsdauer und Handhabung

Reagenz	Lagertemperatur	Handhabung
Lösung A δ	-25 °C bis -18 °C	+2 °C bis +8 °C
Lösung B δ	-25 °C bis -18 °C	+2 °C bis +8 °C

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Komponenten – mehr als einmal – muss vermieden werden. Falls nötig, wird ein Aliquotieren der Testkomponenten nach dem ersten Auftauen empfohlen. Die Packung trägt ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen. Kreuzkontamination kann zu falschen Testergebnissen führen. Fügen Sie Patientenproben und Kontrollen sorgfältig zu. Achten Sie darauf, dass Reaktionsansätze nicht von einem Well ins nächste verschleppt werden. Bei substantiellen Änderungen am Produkt bzw. der Anwendungsvorschrift durch den Anwender kann die Anwendung außerhalb der vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test ist nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum vorgesehen.

- Sämtliche Patientenproben müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Während des gesamten Testverfahrens müssen geeignete Einweg-Schutzhandschuhe getragen werden.
- Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder entsprechend den Hygienevorschriften entsorgt werden. Die Konzentrationsangaben und Inkubationszeiten der Hersteller müssen beachtet werden.
- Vor Durchführung des Tests die gesamte Gebrauchsanweisung durchlesen und sorgfältig befolgen. Abweichungen von den aufgeführten Testprotokollen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Test nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Test mit geöffneter oder beschädigter Verpackungsfolie nicht verwenden.
- Reagenzien vor Hitze und Feuchtigkeit schützen.
- Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien nicht mit Reagenzien aus anderen Chargen oder Chemikalien.
- Eine gute Labortechnik ist für eine optimale Testleistung unerlässlich. Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität des Tests ist darauf zu achten, dass die Reinheit der Materialien und Reagenzien sichergestellt ist.
- Werden im selben allgemein zugänglichen Laborbereich noch andere PCR-Tests durchgeführt, ist sorgfältig darauf zu achten, dass der Test nicht kontaminiert wird. Eine Kontamination des Tests durch Mikroorganismen und Desoxyribonukleasen (DNasen und RNasen) ist stets zu vermeiden.
- Das Labor sollte routinemäßige Überprüfungen des Umfelds durchführen, um das Risiko von Kreuzkontaminationen zu minimieren.
- Bei einer Verschleppung der Proben während der Handhabung und Bearbeitung des Tests, kann es zu falsch positiven Testergebnissen kommen.
- Die Durchführung des COVID-19 *direct* RT-PCR δ Tests außerhalb des empfohlenen Zeitrahmens und Temperaturbereichs für Proben transport und Probenaufbewahrung kann zu ungültigen Ergebnissen führen. Tests, die innerhalb der angegebenen Zeitspannen nicht abgeschlossen werden, sollten wiederholt werden.

- Die Vorgaben einer guten Laborpraxis sind während des Tests einzuhalten.
- Nicht verbrauchte Tests gemäß den örtlichen, regionalen bzw. staatlichen Bestimmungen entsorgen.
- Die Testkits sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen und dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Bei Verdacht auf eine Verunreinigung des Auslesegeräts ist eine Reinigung und Wartung entsprechend dem Systemhandbuch vorzunehmen.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheet, SDS) sind auf Anfrage bei FRIZ Biochem erhältlich.

Um sicherzustellen, dass **RT-PCR-inhibierenden Substanzen** der Patientenprobe die Analyse nicht beeinflussen, ist jeder Reaktion eine Interne Kontrolle zugefügt. Bei dieser wird ein künstliches RNA-Target, welches keine bekannten Homologien aufweist und im selben RT-PCR Ansatz enthalten ist, in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und detektiert. So können falsch negative Testergebnisse durch Inhibition der RT-PCR ausgeschlossen werden.

Die **Positivkontrolle** (SARS-CoV-2 RNA, Laborstandard oder optional von FRIZ Biochem) muss als Patientenprobe behandelt werden und in jeden RT-PCR-Lauf mit einbezogen werden.

Die **Negativkontrolle** (Laborstandard oder optional von FRIZ Biochem) muss als Patientenprobe behandelt werden und in jeden RT-PCR-Lauf mit einbezogen werden.

Eine **fehlgeschlagene Positiv- oder Negativkontrolle** macht den RT-PCR-Lauf ungültig und die Ergebnisse dürfen nicht berichtet werden.

Durchführung des COVID-19 *direct* RT-PCR δ Tests

Probenentnahme und Reagenzien-Vorbereitung

Ausgangsmaterial für den COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test sind 10 μ L einer solubilisierten Patientenprobe je Reaktionsansatz. Die Patientenprobe kann aus Sputum oder Abstrich stammen. Eine vorangegangene Hitzeinaktivierung der Patientenprobe wirkt sich nicht auf die Leistung der im Test eingesetzten Reagenzien aus. Eine mögliche Beeinflussung der Probe in Folge der Hitzeinaktivierung kann nicht ausgeschlossen werden.

	Arbeitsschritt
0	Direkt vor Testbeginn alle Reagenzien vollständig auftauen und kühl halten (+2 °C bis +8 °C). Pro qPCR-Lauf sind eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitzuführen.
1	Setzen Sie die Reaktionslösung an ¹ : geben Sie dazu 15 μ L der Lösung B δ in das Vial der Lösung A δ ; kurz mischen/schütteln und ggf. abzentrifugieren. Nicht vortexen!
2	Pipettieren Sie je 15 μ L der Reaktionslösung in die PCR-Reaktionsgefäße/Wells der Mikrotiterplatten.
3	Fügen Sie je Well 10 μ L einer solubilisierten Patientenprobe bzw. die Positiv- oder Negativkontrolle zu.
4	Verschließen Sie die Mikrotiterplatte mit einer adhäsiven, optischen Folie bzw. die PCR-Reaktionsgefäße mit den vorgesehenen Deckeln.
5	Die Mikrotiterplatte bzw. PCR-Reaktionsgefäße ggf. kurz zentrifugieren.
6	Stellen Sie die befüllte Platte/Reaktionsgefäße in den qPCR Cycler.

¹Verbrauch der Reaktionslösung innerhalb von 4 h nach Ansetzen. Stellen Sie eine durchgehende Lagerung der Reaktionslösung bei +2 °C bis +8 °C sicher.

Einstellungen der qPCR/Detektionskanäle

Der COVID-19 *direct* RT-PCR δ Test wurde mit den Roche LightCycler® Systemen (96/480 II) und mit den Bio-Rad qPCR Cyclern CFX Opus 96™ sowie CFX96™ Dx evaluiert/validiert. Grundlegende Informationen zur Programmierung der verschiedenen real-time Cycler entnehmen Sie bitte der Anleitung des verwendeten qPCR Cyclers.

Reverse Transkription	55 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	2 min
Amplifikation	45 Zyklen	
Denaturierung	95 °C	5 sec
Amplifikation/Elongation	61 °C	15 sec

	SARS-allgemein (E-GEN)	SARS-CoV-2 (N-GEN)	SARS-CoV-2 Delta Mutation L452R (Spike-Gen)	Interne Kontrolle
Reporterfarbstoff	CalFluor Red 610-Sonde	FAM-Sonde	Atto647N-Sonde	HEX-Sonde
Farbe	rot	grün	rot	gelb
Emission	610 nm	510 nm	664 nm	580 nm
Quencher	Black Hole Quencher	Black Hole Quencher	Black Hole Quencher	Black Hole Quencher

Die Angaben zu den Wellenlängen der Detektionskanäle beziehen sich auf den LightCycler® 96 von Roche. Beim LightCycler® LC480 I und LC480 II ist es notwendig, eine Color Compensation anzuwenden. Bei Fragen kontaktieren Sie den Service von FRIZ Biochem.

Ergebnisse

Validierung der Ergebnisse

- Die Negativkontrolle muss unterhalb des Thresholds liegen.
- Die Interne Kontrolle (IC) in der Negativkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Zeigt die Negativkontrolle einen positiven Kurvenverlauf (Kontamination) oder ist die IC in der Negativkontrolle nicht valide, ist der Testlauf nicht auswertbar.
- Die Positivkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der Ct-Wert der Positivkontrolle muss dem Laborstandard entsprechen (optional, bei Verwendung von FRIZ Biochem Positivkontrolle muss der Ct-Wert < 33 sein). Eine Positivkontrolle mit größerem Ct-Wert weist auf Probleme bei der Amplifikation hin.
- Die IC bei negativen Proben muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen.
- Das Signal der IC einer (negativen) Patientenprobe muss mit dem Signal der IC in der Negativkontrolle verglichen werden. Ist der Ct-Wert der IC einer Probe um mehr als 5 höher als der Ct-Wert der IC in der Negativkontrolle oder fehlt das IC-Signal einer (negativen) Probe, weist dies auf Inhibition der RT-PCR-Reaktion hin. In diesen Fällen ist ein negatives Testergebnis nicht valide.

Auswertung der Ergebnisse

Signale, die größer als der Threshold sind, werden als positives Ergebnis bewertet.

Interpretation der Ergebnisse des COVID-19 *direct* RT-PCR^δ Tests:

SARS-allgemein (E-Gen, Red 610)	SARS-CoV-2 (N-Gen, FAM)	Interne Kontrolle (IC, HEX)	Ergebnis	Interpretation
Positiv	Positiv	Positiv/Negativ	Positiv!	SARS-Coronaviren im untersuchten Material gefunden; Bestätigung für SARS-CoV-2. Bei positivem Signal im Atto647N-Kanal liegt die Delta Variante (Mutation L452R) des SARS-CoV-2 vor.
Positiv	Negativ	Positiv/Negativ	Potenziell positiv!	SARS-Coronaviren im untersuchten Material detektiert; keine Bestätigung für SARS-CoV-2; Probe bei Bedarf erneut analysieren. Bei positivem Signal im Atto647N-Kanal liegt die Delta Variante (Mutation L452R) des SARS CoV-2 vor.
Negativ	Negativ	Positiv	Negativ!	Keine SARS-Coronaviren und kein SARS-CoV-2 im untersuchten Material gefunden
Negativ	Positiv	Positiv/Negativ	Potenziell positiv!	Keine SARS-Coronaviren im untersuchten Material detektiert, aber SARS-CoV-2; Probe bei Bedarf erneut analysieren. Bei positivem Signal im Atto647N-Kanal liegt die Delta Variante (Mutation L452R) des SARS-CoV-2 vor.
Negativ	Negativ	Negativ	Ungültig!	Testergebnis ist nicht auswertbar

Die Ergebnisse dienen der Identifizierung von SARS-CoV-2 RNA und der SARS-CoV-2 Delta Variante. Die SARS-CoV-2 RNA ist im Allgemeinen in respiratorischen Proben während der akuten Phase der Infektion nachweisbar. Positive Ergebnisse sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA.

Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA nicht aus, da die Ergebnisse von einer korrekten Probenentnahme, dem Fehlen von Inhibitoren sowie einer ausreichenden Menge zu detektierender RNA abhängen.

Es kann zu ungültigen Ergebnissen kommen, wenn die Probe hemmende Substanzen enthält, die die Lyse, Transkription und/oder Amplifikation und Detektion der Ziel-Nukleinsäuren verhindern. Informationen zu bekannten Störsubstanzen sind dem Abschnitt „Verfahrenseinschränkungen“ zu entnehmen.

Verfahrenseinschränkungen

Testergebnisse sind immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Therapeutische Konsequenzen der Befundung sind im Zusammenhang mit den klinischen Daten zu ziehen.

Zuverlässige Ergebnisse hängen von den korrekten Verfahren zur Probenentnahme, Lagerung und Handhabung ab.

Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet. Befolgen Sie die Vorgehensweisen aus der hier vorliegenden Gebrauchsanweisung.

Dieser Test ist für den Nachweis von SARS-CoV-2 RNA und der **SARS-CoV-2-Virusvariante Delta (mittels der Mutation L452R)** in nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen, Sputum, Aspiraten der unteren Atemwege, bronchoalveolärer Lavage und Nasenspülung/Aspirat, Mund-/Rachenspüllösung oder Nasensauger vorgesehen.

Der Test wurde mit Proben validiert, die in einem Copan UTM-RT System (UTM-RT), BD™ Universal Viral Transport System (UVT), in Yocon VTM/UTM, in NaCl-Lösung, in Amies-Lösung oder in IsoFlow Sheath Fluid (Beckman Coulter) gesammelt wurden. Andere Probentypen können zu ungenauen Ergebnissen führen.

Der Nachweis von SARS-CoV-2 RNA und der **SARS-CoV-2 Delta Virusvariante** ist abhängig von der Probenentnahmemethode, Patientenfaktoren (z. B. Vorhandensein von Symptomen), und/oder Stadium der Infektion.

Aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Technologien wird empfohlen, vor dem Wechsel von einer Technologie zur nächsten die Technologie zu qualifizieren. Benutzer sollten ihre eigenen spezifischen Richtlinien/Verfahren befolgen.

Gute Laborpraxis und sorgfältige Einhaltung der Verfahren, die in dieser Gebrauchsanweisung angegeben sind, sind notwendig, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.

Die Detektion von SARS-CoV-2 RNA und der **SARS-CoV-2 Delta Virusvariante** hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Organismen ab und kann durch das Probenentnahmeverfahren und patientenbezogene Faktoren beeinflusst werden.

Verschiedene Störsubstanzen können zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Der COVID-19 *direct* RT-PCR⁶ Test umfasst eine Interne Kontrolle zur Erkennung von Proben, die Stoffe enthalten, die bei der PCR-Amplifikation störend wirken.

Patientenproben in Lösungen mit chaotropen Salzen wie z. B. Guanidinium-Thiocyanat sind nicht zulässig.

Mutationen oder Polymorphismen in Primer- und Sonden-Bindungsregionen können die Detektion neuer Varianten beeinträchtigen, so dass der COVID-19 *direct* RT-PCR⁶ Test ein falsch negatives Ergebnis liefert.

Analyt-Targets (virale Sequenzen) können *in vivo* unabhängig von der Lebensfähigkeit des Virus weiterbestehen (Kontaminationen). Die Entdeckung von Analyt-Target bedeutet weder, dass entsprechende Viren infektiös sind, noch dass sie die Erreger für klinische Symptome sind.

Es besteht das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination durch Zielorganismen, ihren Nukleinsäuren oder ihrem amplifizierten Produkt.

Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das in der RT-PCR-Technik geschult ist.

Die Verwendung dieses Produkts wurde mit den Roche LightCycler® Systemen (96/480 II) und mit den Bio-Rad qPCR Cyclern CFX Opus 96™ sowie CFX96™ Dx validiert. Ein anderes qPCR System kann unter Umständen zu veränderten Ct-Werten und Ergebnissen führen.

Analytische Leistung

Die analytische Leistungsbewertung wurde initial mittels des COVID-19 *direct* RT-PCR Tests durchgeführt und beschreibt die Sensitivität und Spezifität des Assays bezüglich der SARS-CoV-2 Detektion exklusive der Delta-Mutationsvariante L452R.

Analytische Sensitivität:

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde mit Verdünnungsreihen von SARS-CoV-2 RNA, gespik in negativer synthetischer Matrix mit humaner genomischer DNA (beides von Exact Diagnostics), auf einem LightCycler® 96 System (Roche) ermittelt:

RNA Kopien/Reaktion	N-Gen (Anzahl Positive/gesamt)	N-Gen Hit rate (%)	E-Gen (Anzahl Positive/gesamt)	E-Gen Hit rate (%)
1	7/21	33,33	7/21	33,33
3	17/21	80,95	19/21	90,48
5	20/21	95,24	20/21	95,24
10	11/11	100,00	11/11	100,00
100	3/3	100,00	3/3	100,00
1000	3/3	100,00	3/3	100,00

Die 95 %-Nachweisgrenze (95 CI) wurde mittels Logistischer Regression (Logit) mit der GraphPad Prism 8.4.3 Software bestimmt.

Analytische Sensitivität (LoD_{95 CI}):

N-Gen: LoD_{95 CI} = 5,85 (4,74-7,05) Kopien/Reaktion

E-Gen: LoD_{95 CI} = 4,13 (3,60-4,67) Kopien/Reaktion

Vergleichsstudien zwischen dem COVID-19 *direct* RT-PCR Test und dem COVID-19 *direct* RT-PCR δ zeigen, dass die Einführung zusätzlicher Primer und Sonden für die Detektion der SARS-CoV-2 Delta-Mutation L452R (Spike-Gen) keinen signifikanten Einfluss auf die analytische Sensitivität und Spezifität der SARS-CoV-2 Detektion (N-Gen und E-Gen) hat.

Virusverdünnung B.1.617.2	COVID-19 <i>direct</i> RT-PCR		COVID-19 <i>direct</i> RT-PCR δ		
	N-Gen	E-Gen	N-Gen	E-Gen	L452R
10 ⁻⁴	27,13	28,31	26,61	27,91	29,91
10 ⁻⁵	29,99	31,04	29,59	30,89	32,46
10 ⁻⁶	33,80	35,19	33,83	35,41	37,07

Die analytische Leistung des COVID-19 *direct* RT-PCR Tests bei Verwendung einer Mund-Rachen-Spüllösung (MRS) wurde mittels serieller Verdünnung von SARS-CoV-2 Virus in MRS im Vergleich zu 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl; Sigma Aldrich) bestimmt. Der COVID-19 *direct* RT-PCR Test identifiziert SARS-CoV-2 Virus in MRS sicher bis zu einer Verdünnung von 4x10⁻⁵.

	Virusverdünnung	N-Gen (Ct-Wert)	E-Gen (Ct-Wert)
MRS/SARS-CoV-2	4x10 ⁻²	23,5	23,3
NaCl/SARS-CoV-2	4x10 ⁻²	22,97	22,8
MRS/SARS-CoV-2	4x10 ⁻³	26,54	26,34
NaCl/SARS-CoV-2	4x10 ⁻³	26,49	26,4
MRS/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁴	30,43	30,76
NaCl/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁴	29,97	29,9
MRS/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁵	34,5	40,58

	Virusverdünnung	N-Gen (Ct-Wert)	E-Gen (Ct-Wert)
NaCl/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁵	33,48	34,45
MRS/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁶	n.a.	n.a.
NaCl/SARS-CoV-2	4x10 ⁻⁶	41,09	43,91

Analytische Spezifität

In-silico-Analysen, *In-vitro*-Analysen relevanter humanpathogener Bakterien und Viren sowie Untersuchungen von Störschubstanzen in Nasensprays, Mundspülungen oder Augentropfen (alle unten dargestellt) wurden verwendet, um die analytische Spezifität zu ermitteln:

Analytische Spezifität: 100 %

Die *In-silico*-Analyse für potenzielle Kreuzreaktivitäten wurde mit den Organismen, die in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind, mittels BLAST Alignment mit den bei der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenzen durchgeführt. Identitäten der einzelnen Primer von je unter 80 % zur Target Sequenz wurden als nicht signifikant eingestuft.

In-silico-Analyse zur Kreuzreaktivität:

Organismus	N-Gen Identität [%]		E-Gen Identität [%]		IC Identität [%]	
	Forward Primer	Reverse Primer	Forward Primer	Reverse Primer	Forward Primer	Reverse Primer
Humanes Coronavirus 229E	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Humanes Coronavirus OC43	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Humanes Coronavirus HKU1	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Humanes Coronavirus NL63	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
SARS-CoV	38,10	85,71	100,00	100,00	kein Alignment *	
MERS-CoV	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Adenovirus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Humanes Metapneumovirus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
HPIV1	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
HPIV2	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
HPIV3	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
HPIV4	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Influenza A Virus	kein Alignment *		57,69	81,82	kein Alignment *	
Influenza B Virus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Influenza C Virus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Enterovirus/Rhinovirus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Respiratorisches Synzytial-Virus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Rubella Virus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Parechovirus	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		54,55	85,71
<i>Haemophilus influenzae</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Legionella pneumophila</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Mycobacterium bovis subsp. Bovis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	

Organismus	N-Gen Identität [%]		E-Gen Identität [%]		IC Identität [%]	
	Forward Primer	Reverse Primer	Forward Primer	Reverse Primer	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Streptococcus pyogenes</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Bordetella pertussis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Candida albicans</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Bacillus anthracis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Neisseria elongata</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Neisseria meningitidis</i>	80,95	57,14	kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		50,00	81,82
<i>Staphylococcus aureus</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Streptococcus salivarius</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Leptospiraceae</i>	76,19	80,95	kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Chlamydia psittaci</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Coxiella burnetii</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Legionella	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	
Leptospira	76,19	80,95	kein Alignment *		kein Alignment *	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	kein Alignment *		kein Alignment *		kein Alignment *	

* Forward und Reverse Primer haben jeweils weniger als 80% Sequenz-Identität zum Target

Die *In-silico*-Analyse zeigte nur bei wenigen Organismen eine Identität von über 80 %: Für das N-Gen ergab der reverse Primer eine Sequenzidentität von über 80 % zu SARS-CoV, allerdings liegt die des forward Primer bei nur 38 % und die letzten Basen am 3'-Ende beider Primer sind nicht konserviert. Für das E-Gen ergab der reverse Primer eine Sequenzidentität von über 80 % zu Influenza A, allerdings haben sowohl forward Primer als auch Sonde eine Identität von nur 58 %. Alle anderen Sequenzidentitäten von über 80 % ergaben in der Analyse, dass aufgrund der gemappten Distanz der Primer zueinander keine Amplifikation möglich ist.

In-silico-Analysen zeigten, dass die verwendeten Primer und Sonden des COVID-19 *direct* RT-PCR Tests SARS-CoV-2 spezifisch detektieren. Darüber hinaus wurde die Spezifität des Tests *in vitro* durch Untersuchung weiterer humanpathogener Bakterien und Viren ermittelt. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Als Positivkontrolle dienten hitzeinaktiviertes SARS-CoV-2 Virusmaterial. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die getesteten Mikroorganismen zur Kreuzreaktivität:

Organismus	Menge pro PCR	Ergebnis N-Gen	Ergebnis E-Gen
<i>Acinetobacter baumannii</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Bacillus cereus</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Corynebacterium bovis</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Enterococcus faecium</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
Enterovirus D68 (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Haemophilus influenzae</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
Humanes Coronavirus, NL63 (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
Humanes Coronavirus, 229E (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ

Organismus	Menge pro PCR	Ergebnis N-Gen	Ergebnis E-Gen
Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
Influenza A RNA H3N1 Panel (gRNA)	19,9 Ct	Negativ	Negativ
Influenza A Virus, H3N2 (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
Influenza A Virus, H1N1 (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
Influenza B Virus (gRNA)	1.0E+05 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Lactobacillus salivarius</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Neisseria meningitidis</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ
<i>Staphylococcus aureus</i> SA113 (Kultur)	1.0E+06 CFU	Negativ	Negativ
<i>Staphylococcus.epidermidis</i> M0881 (Kultur)	1.0E+06 CFU	Negativ	Negativ
<i>Staphylococcus.epidermidis</i> W23144 (Kultur)	1.0E+06 CFU	Negativ	Negativ
<i>Streptococcus mutans</i> (gDNA)	1.0E+06 Genomkopien	Negativ	Negativ

Keiner der getesteten Mikroorganismen lieferte ein positives Signal in der COVID-19 *direct* RT-PCR. Die Interne Kontrolle war bei allen Testungen valide.

Interferierende Substanzen:

Um die Wirkung potenziell interferierender Medikationen auf den COVID-19 *direct* RT-PCR Test zu untersuchen, wurde einer negativen natürlichen klinischen nasopharyngealen Matrix mit und ohne hitzeinaktiviertem SARS-CoV-2 Virus die höchste, potenziell in nasopharyngealer Probe vorkommende Konzentration der Substanz beigemischt. Zudem wurde eine Kontrollprobe mit Matrix und hitzeinaktiviertem SARS-CoV-2 Virus, jedoch ohne potenziell interferierende Substanz mitgeführt. Jede Kondition wurde in Triplikaten getestet. Medikationen, die mit COVID-19 *direct* RT-PCR getestet wurden, sowie deren Wirkstoff, die eingesetzte Medikationsmenge und das Ergebnis aus der PCR finden sich in der nachfolgenden Tabelle

Potenziell interferierende Substanzen:

Handelsname	Wirkstoff pro Einheit	% (v/v)*	Ergebnis N-Gen	Ergebnis E-Gen	Ergebnis IC
ratioAllerg® Heuschnupfenspray	50 µg Beclometasondipropionat	15	3/3	3/3	3/3
Otri-Allergie Heuschnupfenspray	50 µg Fluticasonpropionat	15	3/3	3/3	3/3
MometaHEXAL® Heuschnupfenspray	50 µg Mometasonfuorat	25	3/3	3/3	3/3
NASACORT® Nasenspray	55 µg Triamcinolonacetonid	20	3/3	3/3	3/3
Vividrin® akut Nasenspray	140 µg Azelastinhydrochlorid	20	3/3	3/3	3/3
Nasivin® Nasenspray	22,5 µg Oxymetazolinhydrochlorid	10	3/3	3/3	3/3

Handelsname	Wirkstoff pro Einheit	% (v/v)*	Ergebnis N-Gen	Ergebnis E-Gen	Ergebnis IC
NASENSPRAY Heumann	90 µg Xylometazolinhydrochlorid	15	3/3	3/3	3/3
Syntaris® Nasenspray	25 µg Flunisolid	15	3/3	3/3	3/3
Rhinocort Topinasal Nasenspray	64 µg Budesonid	10	3/3	3/3	3/3
CromoHEXAL® Augentropfen	ca 400 µg Natriumglomoglicat	5	3/3	3/3	3/3
Tobrex® Augentropfen	ca 60 µg Tobramycin	5	3/3	3/3	3/3
LISTERINE® Cool Mint Mundspülung	Ethanol (N.N.)	50	0/3	0/3	0/3
		25	3/3	3/3	3/3
Chlorhexamed® FLUID 0,1 %	15 µg Chlorhexidinbis(D- gluconat)	50	3/3	3/3	3/3
Dequonal® Lösung	1,5 mg Dequaliniumchlorid, 3,5 mg Benzalkoniumchlorid	50	3/3	3/3	3/3
Octenident® Mundspüllösung	Octenidin (N.N.)	50	3/3	2/3	0/3
		25	3/3	3/3	3/3

* Konzentration der Medikation im Medikations-Matrix-Gemisch

Mit Ausnahme zweier Mundspüllösungen (LISTERINE® Cool Mint und Octenident®) in ihrer höchsten getesteten Konzentration konnten SARS-CoV-2-positive und -negative Proben (Letztere nicht dargestellt) in Gegenwart der getesteten potenziell interferierenden Substanzen eindeutig identifiziert werden. Für LISTERINE® Cool Mint und Octenident® wurden daher weitere Konzentrationen getestet. Bei beiden waren ab einer Konzentration von 25 % (v/v) das N-Gen, das E-Gen sowie die Interne Kontrolle nachweisbar.

Klinische Leistung (E-Gen und N-Gen)

Die klinische Leistungsbewertung wurde in zwei Laboren (Deutschland, Bayern und Schweiz, St. Gallen im Juli bis Oktober 2020) an anonymisierten Proben im direkten Vergleich zur Standard-Laboranalyse (Isolierung/Aufreinigung der RNA aus Patientenmaterial und anschließende RT-PCR) durchgeführt. Sie umfasste die Analyse von 761 Patientenproben, von denen zwei ungültig waren (IC).

		Standardlaboranalyse		Gesamt
		Positive	Negative	
COVID-19 <i>direct</i> RT-PCR (E-Gen und N-Gen)	Positive	205	1	206
	Negative	1	552	553
Gesamt		206	553	759

Die statische Auswertung (über https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) ergibt folgende Leistungsdaten:

Klinische Leistungsdaten	Wert	95 % CI
Sensitivität	99,51 %	97,33 % bis 99,99 %
Spezifität	99,82 %	99,00 % bis 100,00 %

Klinische Leistung (Delta Virusvariante/Mutation L452R)

Die klinische Leistungsbewertung des COVID-19 *direct* RT-PCR δ Tests wurde an anonymisierten Proben im direkten Vergleich zu einer Sequenzierung durchgeführt. Sie umfasste die Analyse von 63 Patientenproben.

		Sequenzierung		Gesamt
		Delta-Positive	Delta-Negative	
Nachweis Delta-Mutation L452R (COVID-19 <i>direct</i> RT-PCR δ)	Delta-Positive	32	0	32
	Delta-Negative	1	30	31
Gesamt		33	30	63

Die statische Auswertung (über https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) ergibt folgende Leistungsdaten:

Klinische Leistungsdaten	Wert	95 % CI
Sensitivität	96,97 %	84,24 % bis 99,92 %
Spezifität	100,00 %	88,43 % bis 100,00 %











Hinweis an den Anwender

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



Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79EG für *In-vitro*-Diagnostika.

Symbole:

	Für den Einsatz in der <i>In-vitro</i> -Diagnostik		Artikelnummer
	Hersteller		Inhalt reicht für XY Bestimmungen
	Temperaturbegrenzung		Biologisches Risiko
	Verwendbar bis		Chargenbezeichnung
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt

Literatur:

- https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html Zugriff am 19.08.2021
- Singh, J., Rahman, S.A., Ehtesham, N.Z. *et al.* SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat Med* 27, 1131-1133 (2021)

Dokumentenversion:

Dokumentenversionsübersicht	
Version 0.01 Datum: 19.08.2021	Erstveröffentlichung 19.08.2021



FRIZ Biochem GmbH □ Floriansbogen 2-4 □ D-82061 Neuried, Germany
Tel +49 (0) 89 - 72 44 09 25 □ Fax +49 (0) 89 – 72 44 09 10
info@frizbiochem.de □ www.frizbiochem.de

