

RIDA® GENE SARS-CoV-2

REF PG6820



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Zweckbestimmung

Für die in-vitro Diagnostik. Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test, der auf dem Roche LightCycler® 480 II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanem Nasen-/Rachenabstrich von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von SARS-CoV-2-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für den Einsatz durch Fachanwender in Krankenhauslaboren, Referenzlaboren, Privatlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Ende Dezember traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.¹ Anfang Januar konnte von chinesischen Behörden ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Ursache dieser Erkrankungen identifiziert werden.¹ Die durch SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit erhielt den offiziellen Namen COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) und ist von Mensch zu Mensch übertragbar.²

Weltweit wurden bereits 3.925.815 Fälle gemeldet (Stand: 10.05.2020).³ Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden. Deutschlandweit wurden bereits 169.575 Fälle gemeldet (Stand: 11.05.2020).^{4,5} Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.^{1,5}

In den ursprünglichen Leitlinien der WHO wird eine Drei-Target Strategie empfohlen.⁶ Als diese Leitlinie erstellt wurde, lagen nicht genügend Sequenzinformationen für SARS-CoV-2 vor, sodass die von der WHO veröffentlichten Sequenzbereiche einzeln in den Target-Genbereichen nicht spezifisch genug für die Detektion von SARS-CoV-2 RNA waren. Um die Spezifität der Tests für SARS-CoV-2 zu erhöhen wurde dementsprechend eine Drei-Target Strategie verfolgt. Am 17. Januar 2020 wurde diese Drei-Target Strategie auf eine Zwei-Target Strategie reduziert, da das dritte Target eine unzureichende Sensitivität aufwies.

Am 17. März 2020 gab die WHO vorläufige Leitlinien für die Diagnostik von Verdachtsfällen bei einer, durch SARS-CoV-2 verursachten, Coronavirus-Erkrankung (COVID-19) in Hinblick auf die Anforderungen für molekularbiologische Laborteste heraus, in denen es heißt: „In Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, wird die Verwendung eines einfacheren Algorithmus wie beispielsweise der

Detektion eines einzelnen spezifischen SARS-CoV-2 Targets (Ein-Target Strategie) mittels real-time RT-PCR als ausreichend angesehen.“

Die R-Biopharm AG hat bei der Entwicklung des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time RT-PCR Assays von Beginn an die Ein-Target Strategie verfolgt. Unser Ziel war es einen sensitiven und spezifischen SARS-CoV-2 Nachweis mit optimierten Workflow, d.h. ohne weitere notwendige Bestätigung zu etablieren. Dies war zu diesem Zeitpunkt bereits möglich da eine Vielzahl von Genomsequenzen des neuartigen Coronavirus SARS CoV-2 zur Verfügung standen. Im Rahmen von Genomanalysen konnten wir einen Bereich innerhalb des E-Gens identifizieren, welcher spezifisch für SARS-CoV-2 ist. Dieser Bereich liegt etwa 200 Basenpaare downstream von dem WHO publizierten unspezifischen Bereich des E-Gens von SARS-CoV-2. Durch den Nachweis dieses spezifischen E-Genbereichs konnte die R-Biopharm AG dementsprechend die Detektion von SARS-CoV-2 RNA auf nur ein Target reduzieren.

3. Testprinzip

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanem Nasen-/Rachenabstrich von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR-Format, d.h. die Reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für SARS-CoV-2 (E-Gen) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 200 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	4x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	rot
R	Internal Control RNA	4x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR wurde mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Gerät Kombination verifiziert:

Tab.2a: Benötigtes Zubehör (verifiziert)

Extraktionsplattformen	
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II

Des Weiteren ist der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR Test kompatibel für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2b: Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm AG	RIDA® Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben

Für die RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm AG)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test enthält eine Internal Control RNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control RNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control RNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control RNA je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA je Probe

während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen, je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

Weitere Informationen zur Sammlung, Lagerung und zum Transport der Proben siehe WHO Interim guidance, 2 March 2020.

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® 480II und RIDA®CYCLER

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA-Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR-Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Green	-
	ICR	Yellow	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

*1 Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind valide, wenn sie den in der Tabelle angegebenen Bedingungen entsprechen. Der Ct-Bereich für die Positivkontrolle ist auf dem Produkt beigelegten Quality Assurance Certificate angegeben. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht die Bedingungen für einen validen Lauf erfüllen, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von		
SARS-CoV-2	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

SARS-CoV-2 ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

SARS-CoV-2 ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

SARS-CoV-2 ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

Die Gerätenachweisgrenze, mit dem LightCycler® 480II, des RIDA®GENE Assay liegt bei > 50 Kopien / Reaktion. Proben mit einem CT-Wert von > 35 liegen im Bereich der Nachweisgrenze. Hierbei muss beachtet werden, dass die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens von der Probenmatrix, dem Cycler und der RNA-Extraktion abhängig ist und dementsprechend variieren kann. Daher wird empfohlen, diese Proben als nicht eindeutig zu bewerten, die einzelnen Kurvenverläufe auf einen sigmoiden Verlauf zu prüfen und unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik eine entsprechende Verlaufskontrolle anzufordern. Eine Beurteilung dieser Proben obliegt dem entsprechend geschulten Personal.

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für humane respiratorische Proben geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
4. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE SARS-CoV-2 zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
6. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zielgen (E-Gen) vorhanden ist.

7. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Good Laboratory Practice) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480II unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in Duplikaten an 10 Arbeitstagen von unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Inter-Lot Präzision: Die Testungen zur Intra- und Inter-Assay Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test auf dem LightCycler® 480II lagen unter 3 %.

13.2 Analytische Sensitivität

13.2.1 Gerätenachweisgrenze

Zur Ermittlung der Gerätenachweisgrenze wurden 20 Replikaten einer Kontrollprobe (50 Kopien/Reaktion) mit dem LightCycler® 480II gemessen. Alle Replikate wurden positiv bestimmt.

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

13.2.2 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Die Nachweisgrenze des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Tests wurde innerhalb einer externen Studie unter Verwendung des MagNaPure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit und dem LightCycler® 480II ermittelt. Die hier ermittelte LoD 95 % für den RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test beträgt 4,3 Kopien / ml.⁷

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, dem Cycler und der RNA-Extraktion.

13.3 Analytische Spezifität

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test ist spezifisch für humanes SARS-CoV-2 aus Nasen-Rachenabstrich. Ein Sequenz-Abgleich mit Hilfe von bestehenden Nukleotid-Datenbanken (National Center for Biotechnology Information,

NCBI) zeigte eine Spezifität für SARS-CoV-2 und keine signifikante Homologie zu anderen Organismen.

Weiterhin wurden verschiedene Organismen getestet. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10):

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

Human Coronavirus 229E	-	Parainfluenza 1 (strain C35)	-	Enterovirus (Type 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Human Coronavirus OC43	-	Parainfluenza 2 (strain Greer)	-	RSV (strain Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Human Coronavirus NL63	-	Parainfluenza 3	-	RSV (strain 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, strain CH19503)	-	Rhinovirus (Genogruppe A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovirus 7, Human (strain Gomen)	-	Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 1, Human (strain Adenoid 71)	-	Influenza B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Human Metapneumovirus	-	Influenza Virus B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Analytische Reaktivität

Die analytische Reaktivität der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR wurde an Hand der Ringversuchsprobe INSTAND e.V. RV 340059 nachgewiesen (s. Tab. 11).

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von RT-PCR Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen die aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten untersucht (s. Tab. 12).

Tab. 12: Interferierende Substanzen

Wirkstoff / Pharmazeutikum	Konzentration
Ethanol	5 % [v/v]
Guanidinhydrochlorid	5 % [w/v]
Azithromycin	84 mg/mL
Mucine	60 µg/mL
Xylomethazolin/Nasenspray ratiopharm®	10 % [v/v]
Beclomethasondipropionat	10 % [v/v]
Paracetamol	10 mg/mL
Amoxicillin	1 mg/mL
Humanblut	2 % [v/v]
Dihydrocodein	10 % [v/v]










Die in Tabelle 12 aufgeführten Substanzen zeigten bei den jeweils getesteten Konzentrationen keine interferierende Wirkung.

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-10-28	Vorversion
2022-01-28	Anpassung Übersetzungsfehler der Matrix („Nasen-/Rachenabstrich“) in den Sprachen EN, ES, FR, IT, PT

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)