

Echtzeit-PCR-Test für den professionellen Einsatz

Diese Anleitung muss vor der Verwendung sorgfältig gelesen werden. Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse kann nicht garantiert werden. Wenn Abweichungen von den Anweisungen vorliegen.

1. VERWENDUNGSZWECK

Der AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit (CE-IVD) soll zum qualitativen Nachweis des neuen Coronavirus (SARS-CoV-2) verwendet werden. Probenmaterial ist virale Nukleinsäure, extrahiert aus bronchoalveolarer Spülflüssigkeit, Sputum, Hals- und Nasentupfern, Viruskonservierungspuffer, universelle Transportmedien (UTM), Serum usw. Der Kit ist für die Verwendung durch professionelles Personal des klinischen Labors unter angemessener Laborpraxis vorgesehen.

2. KOMPONENTEN DES SATZES

Das Produkt „AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit“ enthält 100 Tests/Kit. Die Komponenten sind unten aufgeführt.

- 5X RT-qPCR Puffer (Verschlussetikett: 5X Puffer): 1 Ampulle enthält 400 µl
- 20X Enzymlösung (Verschlussetikett: 20X ES): 1 Ampulle enthält 100 µl
- 4X Oligo Mischung (Verschlussetikett: 4X OM): 1 Ampulle enthält 500 µl
- Positivkontrolle (Verschlussetikett: PC): 1 Ampulle enthält 100 µl
- Negativkontrolle (Verschlussetikett: NC): 1 Ampulle enthält 100 µl

3. PRINZIP DES PRÜFVERFAHRENS

Das Testprinzip basiert auf TaqMan Echtzeit-qPCR. Nach dem Öffnen der Kitbox den 5X RT-qPCR-Puffer (5X Puffer, 400 µl), die 20X Enzymlösung (ES, 100 µl), die 4X Oligo-Mischung (4X OM, 500 µl) und die Positivkontrolle (PC, 100 µl) und DEPC-Wasser für die Negativkontrolle (NC, 100 µl) resuspendieren. Die Erzeugung von Luftblasen ist zu vermeiden. Dann aliquotieren Sie den 5X RT-qPCR Puffer (4 µl), die 20X Enzymlösung (1 µl), die 4X Oligo Mischung (5 µl), die RNA-Matrize (5 µl oder 10 µl), den PC (10 µl); das verbleibende Volumen sollte mit DEPC auf das Reaktionsvolumen von 20 µl in das PCR-Röhrchen oder die PCR-Platte für die ausgewählte PCR-Plattform eingestellt werden. Aliquotieren Sie entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben in die well(s) und stellen Sie eine well(s) für die Positivkontrolle (PC) und eine andere well(s) für das DEPC-Wasser für die Negativkontrolle (NC) bereit. Alle Präparationsreaktionsmischungen sind in den Probenverarbeitungsbereich zu überführen. Eine 5 µl oder 10 µl (hier nicht mit DEPC-Wasser eingestellt) RNA-Probe der folgenden in die entsprechenden well(s) entsprechend dem Plattenaufbau mit der Probe(n) für die Positiv- und Negativkontrolle geben. Nach Zugabe der Proben für die Positiv- und Negativkontrolle den Deckel sofort wieder aufsetzen. Kurz zentrifugieren, um Luftblasen zu entfernen. Übertragen Sie die Mischung in den Amplifikationsbereich. Stellen Sie die Röhrchen auf den Probenhalter des Geräts. Richten Sie die Prüftafel gemäß den Positionen der RNA-Proben für die Positiv- und Negativkontrolle ein. Wählen Sie die Erkennungskanäle wie folgt aus: Wählen Sie FAM (S-Gen), HEX (RdRp-Gen) und alle Kanäle für IPC aus, um SARS-CoV-2-Virus-RNA nachzuweisen. Das Produkt „AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit“ basiert auf einer Nicht-ROX-Option.

4. LAGERUNG, HALTBARKEIT UND HANDHABUNG VON REAGENZIEN

- Alle Reagenzien sollten bei -10 °C ~ -30 °C gelagert werden. Eine Lagerung bei +4 °C wird nicht empfohlen.
- Alle Reagenzien können bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 3x) sollte vermieden werden, da dies die Empfindlichkeit der Prüfung verringern kann.
- Alle Reagenzien sollten während der Zubereitung der Mischung mit Eis behandelt werden.
- Oligo Mix (OM) sollte im Dunkeln gelagert werden.
- Nicht mehr als 5 Mal wiederholt einfrieren und auftauen und Licht vermeiden, wenn der Kit aufbewahrt oder verwendet wird.

5. WEITERE ERFORDERLICHE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Laminar Flow Box
- RNA-Extraktionssatz
- Kryobehälter
- Sterile Filterspitzen für Mikropipetten
- Einweghandschuhe, puderfrei
- Kühl- und Gefrierschrank
- Vortex-Mischer
- Echtzeit-PCR-System
- Echtzeit-PCR-Reaktionsröhrchen / -platten
- Pipetten (0,5 µl - 1000 µl)
- Sterile Mikroröhrchen
- Biohazard-Abfallbehälter
- Rohrgestelle
- Tischmikrozentrifuge für Eppendorf-Röhrchen

6. WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie diese Anleitung sorgfältig durch, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen.
- Nur zur In-vitro-Diagnose.
- Das Prüfverfahren muss von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.
- Klinische Proben sollten als potenziell infektiöses Material angesehen und in einer Laminar-Flow-Haube zubereitet werden.
- Das Prüfverfahren muss gemäß der Guten Laborpraxis durchgeführt werden.
- Verwenden Sie den Kit nicht nach dem Ablaufdatum.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Reagenzien sollte vermieden werden, da dies die Empfindlichkeit der Prüfung verringern kann.
- Nach dem Auftauen der Reagenzien die Röhrchen vor Gebrauch kurz vortexen und zentrifugieren.
- Bereiten Sie die Reaktionsmischung schnell auf Eis oder im Kühlblock zu.
- Richten Sie zwei separate Arbeitsbereiche ein:
 - Isolierung der RNA / DNA und
 - Amplifikation / Nachweis von Amplifikationsprodukten.
- Pipetten, Fläschchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht zwischen den Arbeitseinheiten zirkulieren.
- Verwenden Sie immer sterile Pipettenspitzen mit Filtern.
- Tragen Sie in jedem Bereich separate Mäntel und Handschuhe.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Im Labor nicht essen, trinken oder rauchen.
- Aerosole sind zu vermeiden

7. EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Kit muss bis zum Verfallsdatum bei Lagertemperatur aufbewahrt werden. (Lagertemperatur -10 °C ~ -30 °C, Verfallsdatum 18 Monate nach Herstellung, 20 Tage nach dem Öffnen)
- Das Produkt muss von Licht ferngehalten werden.
- Während des Prüfverfahrens auf Eis verwenden.
- Dieses Produkt darf nur von Personal verwendet werden, das speziell in den Techniken der Echtzeit-PCR und der In-vitro-Diagnoseverfahren geschult ist.
- Eine gute Laborpraxis ist für die ordnungsgemäße Durchführung des Prüfverfahrens unerlässlich. Es sollte äußerst sorgfältig darauf geachtet werden, die Reinheit der Komponenten des Satzes und der Reaktionskonfigurationen zu erhalten. Alle Reagenzien sollten sorgfältig auf Verunreinigungen und Verschmutzungen überwacht werden. Verdächtige Reagenzien sollten verworfen werden.
- Für die optimale Durchführung dieses Tests sind geeignete Verfahren zur Probenentnahme, zum Transport, zur Lagerung und zur Verarbeitung erforderlich.
- Dieses Prüfverfahren ist nicht für die direkte Verwendung der Probe konzipiert. Vor Verwendung dieses Prüfverfahrens müssen geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren durchgeführt werden.
- Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Wie bei jedem diagnostischen Test sollten die Ergebnisse des SARS-CoV-2-Virus unter Berücksichtigung aller klinischen und Laborbefunde interpretiert werden.

8. PROBENNAHME, LAGERUNG UND TRANSPORT

- Proben in sterilen Röhrchen sammeln;
- Proben können sofort entnommen oder bei -20°C bis -80°C eingefroren werden.
- Der Transport von klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport ätiologischer Wirkstoffe entsprechen

9. VERFAHREN

9.1. Extraktion von viraler Nukleinsäure
Es sind verschiedene Markensätze zur Extraktion viraler Nukleinsäuren erhältlich. Sie können Ihre eigenen Extraktionssysteme oder den gewerblichen Kit verwenden. Befolgen Sie für die Extraktion von viraler Nukleinsäure die Anweisungen des Herstellers. Der empfohlene Extraktionsansatz ist wie folgt:

Satz für die Extraktion von virale Nukleinsäure	Kat. Nr.	Hersteller	Anmerkung
AddPrep-Satz für die Extraktion von viraler Nukleinsäure	10034	AddBio Co. (www.addbioinc.com)	CE-gemarknet

9.2. Reaktionsgemisch und PCR-Bedingungen

Reaktionsgemisch		PCR-Bedingung		
Komponente	Volume	Temperaturregler	Zeit	Wiederholungszyklen
5X RT-qPCR Puffer (5X Puffer)	4 µl	50°C	20 min	1
20X Enzymlösung (20X ES)	1 µl	95°C	10 min	1
4X Oligo Mischung (4X OM)	5 µl	95°C	25sec	40
RNA-Matrize (oder PC, NC)	10 µl	60°C	50sec	
Gesamtreaktionsvolumen	20 µl			

9.3. Ergebnisinterpretation

Die Interpretation der Ergebnisse basiert auf der Amplifikationskurve der Option mit Nicht-ROX-Kanal. Bei Ct ≤ 38 ist die Erkennung gültig und Benutzer können die nachfolgende Analyse fortsetzen:

- a) Wenn eine typische S-Typ-Amplifikationskurve durch den FAM-Kanal (S-Gen) erfasst wird, bei Ct ≤ 38 ist das SARS-CoV-2-Virus positiv.
- b) Wenn eine typische S-Typ-Amplifikationskurve durch den HEX-Kanal (RdRp-Gen) erfasst wird, bei Ct ≤ 38 ist das SARS-CoV-2-Virus positiv.

Wenn bei der internen Positivkontrolle (IPC) keine typische S-Typ-Amplifikationskurve von Ct oder Ct > 38 durch den Cy5-Kanal (Brassica rapa) erfasst wurde, bedeutet dies, dass die Störsubstanzen hemmend reagieren. Benutzer müssen das Experiment wiederholen. Bei jeder Reaktion mit positiven und negativen Proben wird IPC amplifiziert. Wenn der IPC nicht verstärkt, ist das Testergebnis der Probe ungültig. Die Ursache sollte gefunden und beseitigt werden. Benutzer sollten die Probenahme und das Experiment wiederholen. (Wenn das Ergebnis des erneuten Tests immer noch ungültig ist, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.)

10. ERGEBNISANALYSE

Alle Ergebnisse basieren auf Ct-Werten, die automatisch von der Software berechnet werden.

10.1. Fluorophor und Grenzwert

Ziel	Fluorophor	Cut-Off des Ct-Wertes
S-Gen	FAM	<38
RdRp-Gen	HEX	<38
IPC	Cy5	<38

* Beziehen Sie sich auf die entsprechende Schwellenwertlinie für jedes Gerät

10.2. Interpretation der Probenergebnisse

Probe	S-Gen	RdRp-Gen	IPC	Ergebnis
	FAM	HEX	Cy5	
Negative	-	-	+	Gültig, SARS-CoV-2-Virus nicht erkannt
	-/+	-/+	-	Ungültig, erneut testen
Positive	+	-	+	Ungültig, erneut testen
	-	+	+	Ungültig, erneut testen
	+	+	+	Gültig, SARS-CoV-2-Virus erkannt
	-/+	-/+	-	Ungültig, erneut testen

* Cut off: < 38 Ct

10.3. Fehlerbehebung

Problem	Mögliche Ursache	Beseitigung
Es kann kein Signal in allen Kanälen einschließlich der Positivkontrolle angezeigt werden	Fehlbedienung des Geräts	Bitte überprüfen Sie die Echtzeit-PCR-Bedingung und führen Sie das Prüfverfahren unter der richtigen Einstellung durch
	Falsche Zubereitung der Mischung	Bitte überprüfen Sie alle Komponenten und wiederholen Sie den Test
	Lagerbedingungen nicht erfüllt	Wiederholen Sie das Prüfverfahren mit frischen Reagenzien
Falsch positives Ergebnis bei der Negativkontrolle	Kontaminationssverschleppung	Verwerfen Sie alle Komponenten des Prüfverfahrens. Wiederholen Sie das Prüfverfahren mit neuen Komponenten
Inakzeptable Positivkontrolle	Abbau der Positivkontrolle	Aliquotieren beim Auftauen der Positivkontrolle. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen
	Falsche Zubereitung	Bitte bestätigen Sie das Protokoll und wiederholen Sie das Prüfverfahren.
Hoher Ct-Wert von IPCC	Hohe Probenkonzentration	Nach Verdünnung der DNA mit nukleasefreiem Wasser erneut testen

10.4. Prüfgeräte

Geräte	Hersteller	Kat. Nr.
BioRad Echtzeit-PCR-Gerät	BioRad Laboratories Inc, USA	CFX96 Echtzeit-PCR-System
ABI Echtzeit-PCR-Gerät	Thermo Scientific, USA	ABI 7500 Fast RT-PCR

11. LEISTUNGSBEURTEILUNG

11.1. Limit of Detection (Analytical Sensitivity)

Die Nachweisgrenze wird als Kopienzahl von Verdünnungsmitteln bestimmt, die einen 100%-igen Nachweis von bis zu 50 Kopien des SARS-CoV-2-Virus zeigten. Das S-Gen wurde zu 33,3% und das RdRp-Gen zu 45,8% ab 15 Kopien bei einem Prüfverfahren mit niedrigerem Nachweis nachgewiesen.

11.2. Analytische Spezifität mit Störsubstanzen

Der AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit wurde mit einer Störsubstanz unter Verwendung einer Standardsubstanz als minimale Nachweisgrenzkonzentration untersucht. Eine Charge wurde verwendet und 3 Wiederholungen wurden mit einem Gerät durchgeführt. Als Ergebnis wurde bestätigt, dass es keinen Einfluss auf die Testergebnisse gab.

11.3. Diagnostische Spezifität (Kreuzreaktion)

Die Kreuzreaktionsuntersuchung wurde mit Krankheitserregern (25 Viren und Bakterien) und viruspositiven Substanzen (1 Probe) durchgeführt. Es wurde bestätigt, dass positive Proben nachgewiesen und negative Proben nicht nachgewiesen wurden. Die interne Positivkontrolle (IPC), die die Hemmung der PCR-Reaktion bestätigen kann, wurde in allen Reaktionslösungen nachgewiesen, bei denen eine bemerkenswerte Wirksamkeit des Tests bestätigt werden konnte. Der Test wurde dreimal wiederholt, wobei eine Charge in einem Gerät verwendet wurde.

Nr.	Mikroorganismus
1	Twist Synthetic SARS-CoV-2 (EPI_ISL_418227) RNA
2	Twist Synthetic Influenza H1N1 (2009) RNA
3	Twist Synthetic Influenza H3N2 RNA

4	Twist Synthetic Influenza B RNA
5	Twist Synthetic Human coronavirus 229E RNA
6	Twist Synthetic Human coronavirus OC43 RNA
7	Twist Synthetic SARS coronavirus Tor2 RNA
8	Twist Synthetic MERS coronavirus 2c EMC/2012 RNA
9	Human metapneumovirus
10	Human Coronavirus NL63
11	Human Respirovirus 3 (Parainfluenza virus 3)
12	Human Respirovirus 1 (Parainfluenza virus 1)
13	Human Rhinovirus 14
14	Legionella pneumophila subsp. Pneumophila
15	Legionella pneumophila subsp. Fraseri
16	Streptococcus pyogenes
17	Mycobacterium smegmatis
18	Mycobacterium diernhoferi
19	Mycobacterium terrae
20	Mycobacterium flavescens GTC 608
21	Shigella flexneri
22	Shigella boydii
23	Salmonella enterica
24	Salmonella bongori
25	Vibrio parahaemolyticus
26	Yersinia enterocolitica

11.4. Wiederholbarkeitstest

Wiederholbarkeitstest mit dem AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit, die Messung jeder Probe wurde dreimal wiederholt (3X LoD, 1X LoD, 0,5X LoD); Zwei Testlabors verwendeten eine Charge bei demselben Experiment zweimal pro Experiment (morgens / abends) für 20 Tage. Das Ergebnis des Experiments zeigte, dass 100% aller Proben in mäßig positivem (3X LoD) und 100% in niedrig positivem (1X LoD) nachgewiesen wurden. Bei den folgenden Konzentrationen wurde die minimale Nachweisgrenze (0,5X LoD) 37,5% für das S-Gen und 42,5% für das RdRp-Gen erfolgreich nachgewiesen. Als Ergebnis wurde die Wiederholbarkeit des AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit innerhalb von 5% des CV bestätigt.

11.5. Reproduzierbarkeitstest

Das Ergebnis des Reproduzierbarkeitstests zeigte, dass 100% aller Proben im mäßig positiven (3X LoD) und 100% im schwach positiven (1X LoD) Bereich nachgewiesen wurden. Als Ergebnis wurde für das S-Gen (37,8%) bzw. das RdRp-Gen (31,1%) 0,5X LoD nachgewiesen. Die Reproduzierbarkeit des AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit wurde innerhalb von 5% des CV bestätigt.

11.6. Klinische Sensitivität und Spezifität

Nasopharyngeal-Abstriche (Ziel: S-Gen und RdRp-Gen)	Prüfergebnisse	
	Positiv	Negativ
AddMedi SARS-CoV-2 RT-qPCR Kit	48	0
	2	30
SARS-CoV-2 Nachweisempfindlichkeit = 96,00% (48/50) (95% CI: 86,54% ~ 98,90%)		
SARS-CoV-2 Nachweispezifität = 100,00% (30/30) (95% CI: 88,65% ~ 100,00%)		

12. Literaturverzeichnis

- Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (2016) zu Pflegekomponenten von Infektionspräventionsprogrammen auf nationaler und akuter Ebene.
- „Zwischenrichtlinien zur biologischen Sicherheit im Labor für die Handhabung und Verarbeitung von Proben im Zusammenhang mit der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19)“
- Klinische Behandlung schwerer akuter Atemwegsinfektionen bei Verdacht auf eine neuartige Coronavirus-Infektion (nCoV). Zwischenrichtlinie. WHO. 2020.
- Richtlinie für Tests mit Coronavirus-Krankheit 2019 während des Notfalls im Bereich der öffentlichen Gesundheit. USFDA.

13. Verweise

- Seyed A.H., Saghar S., Hamed G.M., Majid G. and Amir A. 2021. High prevalence of SARS-CoV-2 and influenza A virus (H1N1) coinfection in dead patients in Northeastern Iran. Journal of Medical Virology. 93:1008 - 1012.
- Seyed A.H., Amirhosein K., Hamed G.M., Majid G., Mohammadreza T., Hasan N.A. and Amir A. 2020. Development of a PCR-RFLP method for detection of D614G mutation in SARS-CoV-2. Infection, Genetics and Evolution. 86:104625.
- Ayad M. A., Mohammed A., Mohammed H.F., Hassan M.T. and Hassan M.R. 2020. SARS-CoV-2 Reinfection in Patients Negative for Immunoglobulin G Following Recovery from COVID-19. MedRxiv and BioRxiv. doi: https://doi.org/10.1101/2020.11.20.20234385.

AddBioMeditek Co., Ltd.
41 Techno 1-ro, Yuseong-gu
Daejeon 34015, Republik Korea
Tel. +82 - 42 - 719 - 2035
Fax. +82 - 42 - 934 - 2029
E-mail. addbiomeditek.com
Homepage. addbiomeditek.com

Europäischer Vertreter

EC REP JTC Diagnosemittel UG
Schulweg 8, D-34516 Voehl
Deutschland

• Symbolbeschreibung

Symbol	Symboltitel	Symbol	Symboltitel
	Hersteller		Katalog Nummer
	CE Kennzeichnung		Achtung
	Verwendbar bis / Verfallsdatum		In-vitro-Diagnostica
	Gebrauchsanweisung beachten		Biogefährdung
	Chargenbezeichnung		Negativ Kontrolle
	Temperaturgrenzung		Positiv Kontrolle
	Inhalt		Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft

