

Ergebnisse:

Sensibilität und Spezifität des Meril COVID-19 One-step RT-PCR Set

Meril COVID-19 One Step RT-PCR Kit	SARS CoV-2 in Echtzeit PCR-bestätigte Proben			Total
	Positiv	Negativ	Total	
Positiv	20	0	20	
Negativ	0	75	75	
Total	20	75	95	

Parameter	Schätzung (%)	Untere-Obere 95% KI
Spezifität	100	88-100
Sensibilität	100	83-100

Analytische Sensibilität der Tests:

Nachweisgrenze (LOD) für die N-Probe ist < 500 RNA Kopien/ ml.

Warnungen und Vorsichtshinweise:

- Dieses Produkt wird nur für die *in vitro*-Erkennung verwendet. Bitte lesen Sie sich diese Anleitung vor der Verwendung sorgfältig durch.
- Das Laborpersonal sollte im Hinblick auf die Vorgänge geschult sein und sich mit dem Instrument auskennen, bevor die Untersuchung durchgeführt wird. Bei jeder Untersuchung sollte Qualitätskontrolle stattfinden.
- Das Labormanagement sollte streng gemäß den Vorgaben für PCR-Genvervielfältigung erfolgen. Das Laborpersonal muss ordentlich ausgebildet sein, und der Untersuchungsprozess muss sauber in Abschnitte unterteilt sein. Alle Verbrauchsgüter sollten nach Sterilisierung nur ein einziges Mal verwendet werden. Die Instrumente und Anlagen sollten jedem Abschnitt der Untersuchung zugewiesen und können nicht untereinander ausgetauscht werden.
- Alle Proben sind als möglicherweise infektiöses Material anzusehen. Die Labormitarbeiter tragen eine angemessene persönliche Schutzausrüstung (PSA), die auch Handschuhe, einen Laborkittel oder -mantel umfasst. Die Handschuhe sind regelmäßig auszutauschen, um eine Kreuzkontamination zwischen den Proben zu vermeiden.
- Klinische Labore, in denen möglicherweise infizierte Proben bearbeitet werden, sollten als Class II Biological Safety Cabinet (BSC) in einer BSL-Einrichtung zertifiziert sein. Die Diagnostiktests sind anhand der folgenden Standard-Laborverfahren durchzuführen, wenn möglicherweise die Proben von Patienten bearbeitet werden. Für Laborabfälle sind die Standardverfahren wie im Zusammenhang mit sonstigen respiratorischen Krankheitserregern einzuhalten

IFU/NCVPCR02/07
Datum: 23/10/2020

Meril COVID-19 One-step RT-PCR Set

Produktcode : NCVPCR-01
Packungsgröße : 32 Tests
Produktcode : NCVPCR-02
Packungsgröße : 96 Tests

Einleitung:

Das Coronavirus gehört zur Familie der Coronaviridae, innerhalb der Ordnung der Nidovirales. Es besteht aus einer positiv-einzelsträngigen RNA, treten üblicherweise in 80-120 nm großen Viruspartikeln auf und haben kränzförmige Spitzen an der Oberfläche. Diese große Virenfamilie kommt bei Wirbeltieren häufig vor, z. B. bei Kamelen, Katzen und Fledermäusen. Das neuartige Coronavirus (COVID-19) wurde als neuer Strang der Coronaviren identifiziert. Es kann beim Menschen eine virale Lungenentzündung und Dyspnoe auslösen.

Beabsichtigte Verwendung:

Das Set wurde entwickelt, um COVID-19 mithilfe von Echtzeit-PCR nachzuweisen. Die Ergebnisse können als Unterstützung zur Diagnose von Patienten mit einer COVID-19-Infektion verwendet werden und eine molekular-diagnostische Basis für infizierte Basis darstellen.

Die Testergebnisse dieses Sets dienen nur der klinischen Referenz und sollten nicht als einziger Standard für die klinische Diagnose herangezogen werden. Es wird empfohlen, eine umfassende Analyse durchzuführen, indem das Testergebnis in der Gesamtschau mit den Symptomen des Patienten und anderen Laboruntersuchungen betrachtet wird.

Prinzip:

Der Primer und die Testmischung in diesem Set nutzen das Dual-Target-Genverfahren, das auf die spezifisch konservierte Sequenzkodierung des ORF 1ab-Gens und des Nukleoprotein N-Gens abzielt. Mit der bereitgestellten PCR-Reaktionsmischung kann die Vervielfältigung der Vorlage quantitativ durch Steigerung des mit einem Echtzeit-PCR-Instrument erfassten fluoreszierenden Signals überwacht werden.

Das PCR-Erkennungssystem enthält einen endogenen, internen Primer und die Testmischung. Das Ergebnis der internen Kontrolle zeigt die Genauigkeit der Probe und des Entnahmeprozesses an, um falsch negative Merkmale zu vermeiden.

Set-Bestandteile:

Das Set enthält die Echtzeit-PCR-Vervielfältigungsreagenzien und besteht aus folgenden Bestandteilen:

Ifd. Nr.	Bestandteile	Menge (32 Test)	Menge (96 Test)
1	COVID-19 Enzyme-Mischung (gefriergetrocknet)	32 Tests/Flasche	96 Tests/Flasche
2	COVID-19 Primer-Testmischung	32 µL/Fl.	100 µL/Fl.
3	Enzyme-Mischung Puffer (5x)	130 µL/Fl.	400 µL/Fl.
4	COVID-19 PCR Positiv-Kontrolle	30 µL/Fl.	90 µL/Fl.
5	COVID-19 PCR Negativ-Kontrolle (DEPC-behandeltes H ₂ O)	30 µL/Fl.	90 µL/Fl.

Aufbewahrung und Haltbarkeit:

- Die Haltbarkeit der Reagenzien im Set beträgt 12 Monate. Das Herstellungsdatum ist auf der Schachtel angegeben.
- Die Reagenzien sind im Dunkeln bei -20 ± 5 °C gelagert werden.
- Wiederholtes Auftauen und wieder Einfrieren nicht häufiger als 10 Mal.
- Die wieder flüssig gewordenen Reagenzien sind sofort zu verwenden. Übrig gebliebene Reagenzien sind bei 4°C für höchstens 1 Woche aufzubewahren.

Instrumente-Kompatibilität:

Dieses Set ist kompatibel mit den Echtzeit-PCR-Instrumenten mit FAM, HEX/VIC, RED/ROX-Kanälen.

Anforderungen an die Probe

- Art der Probe: Abstriche des Nasen-Rachen-Raums, des Oropharyngealtubus, Rachenabstriche, Serum und Puffer für den Virenerhalt.
- Probennahme: Gemäß den üblichen Methoden zur Probennahme zu entnehmen
- Aufbewahrung & Transport der Probe: Die zu testende Probe kann sofort verarbeitet oder bei -20 ± 5 °C aufbewahrt werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren sind zu vermeiden. Die Probe ist mit



Obelis s.a., Bd General Wahis 53, 1030, Brüssel, Belgien.

T +32 (0) 2 732-59-54, F +32 (0) 2 732-60-03, E mail@obelis.net



Symbols used on Meril Diagnostics labels:

- Catalogue No.
- Batch No.
- Caution
- Manufacturer
- Expiry Date
- Keep away from direct sunlight
- Manufacturing Date
- Keep Dry
- Do not use if box open or damaged
- Storage Temperature
- Sufficient for
- European health & safety product label
- In vitro Diagnostics
- Authorized European Representative in the European Community



Kühlpacks in einer versiegelten Box aus Styropor oder einer Eiskiste zu transportieren.

Vorbereitung vor dem Test:

Bitte befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers, um die Viren-RNA mithilfe des Sets zur RNA-Extraktion aus der klinischen Probe zu extrahieren. Die extrahierte RNA kann direkt für die PCR-Untersuchung verwendet werden. Ansonsten ist die RNA-Probe bei -70°C aufzubewahren, wenn sie nicht verwendet wird. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren sind zu vermeiden.

Hinweis: In diesem Produkt ist kein Set zur RNA-Extraktion enthalten, und es ist kompatibel mit dem Qiagen/Thermo Viral RNA-Set und allen anderen kommerziellen Sets.

Versuchsplanung:

1. Vorbereitung der Reagenzien (wird im Bereich der Verarbeitung der Reagenzien durchgeführt)

1.1 Vorbereitungen Master Mix:

Die Bestandteile aus der Schachtel nehmen und bei Raumtemperatur auftauen lassen, bis sie sich akklimatisiert haben. Den gefriergetrockneten Enzyme-Mix in 400 µL Enzyme-Mix-Puffer suspendieren. 500 µL RNase-freies Wasser hinzugeben und vorsichtig mit der Pipette nach oben und unten bewegen. Bläschenbildung vermeiden. Die Wände des Röhrchens mithilfe der Pipette abspülen, um zu verhindern, dass dort gefriergetrocknetes Pulver hängen bleibt. Das Röhrchen für 30 Minuten auf die Seite stellen.

Hinweis: Das wiederhergestellte, flüssige Reagenz sollte sofort zu verwenden. Verbleibende Reagenzmengen sind bei 4°C für maximal 1 Woche aufzubewahren.

1.2 Vorbereitung Reaktions-Mix:

Die zur Verwendung empfohlene Probenmengen beträgt 5 µL oder 10 µL. Für die Vorbereitung des Reaktions-Mix, siehe die folgenden Spalten:

1 x benötigte Menge		
	Bei 5 µL-Probe	Bei 10 µL-Probe
Re-suspendierter Master-Mix	9 µL	9 µL
ORF1ab/N/ICON Primer & Testmischung (FAM/HEX/ROX)	1 µL	1 µL
RNase-freies Wasser	5 µL	-
Gesamtmenge	15 µL	10 µL

※ Entsprechend der Anzahl Tests zu multiplizieren.

1.3 15 µL (oder 10 µL, je nach Probenmenge) des vorstehenden Reaktions-Mixes in des PCR-Trägers der ausgewählten PCR-Plattform verteilen. Je nach Anzahl der zu testenden Proben auf eine entsprechende Anzahl Behälter verteilen und je einen Behälter für die Positivkontrolle und die Negativkontrolle ergänzen. Den Reaktions-Mix in den Bereich zur Probenbearbeitung mitnehmen.

2. Hinzufügung der Proben (im Bereich zur Probenbearbeitung)

2.1 Für 5 µL-Proben: 5 µL der folgenden Bestandteile in die je nach Plattenaufbau geeigneten Behälter geben: Probe(n), Positivkontrolle, Negativkontrolle

2.2 Für 10 µL-Proben: Die Positivkontrolle mit 5 µL DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µL Gesamtvolumen verdünnen. 10 µL der folgenden Bestandteile in die je nach Plattenaufbau geeigneten Behälter geben: Probe(n), verdünnte Positivkontrolle, Negativkontrolle

2.3 Nachdem die Proben hinzugefügt wurden, sofort den Deckel schließen. Kurz in der Zentrifuge schleudern, um Luftbläschen zu beseitigen. Die Mischung in den Vervielfältigungsbereich geben.

3. PCR-Vervielfältigung (im Bereich für die Vervielfältigung und Analyse durchführen)

3.1 Die Röhrchen auf Probenhalter im Instrument setzen. Das Testpanel in Abhängigkeit der Positionen der Positivkontrolle, Negativkontrolle und der RNA-Proben aufbauen.

3.2 Die Nachweiskanäle wie folgt anordnen:

- Die FAM (ORF-1a-Gen) und HEX (N-Gen)-Kanäle zum Nachweis von COVID-19 RNA verwenden.
- Den ROX-Kanal zum Nachweis der internen Kontrolle verwenden.

3.3 Das Vervielfältigungsprogramm aufrufen. Die Empfehlung lautet wie folgt:

Schritt	Temp.	Dauer	Zyklus	
1	Reverse Transkription	50°C	15 min	1
2	cDNA erste Denaturierung	95°C	3 min	1
3	Denaturierung	95°C	15 sec	40
4	Anlassen, Vervielfältigung und Fluoreszenz-Messung	55°C	40 sec	
	Abkühlen	25°C	10 sec	1

Die Datei nach Vornahme der Einstellungen abspeichern und die Reaktion starten. Bitte die interne Fluoreszenz-Kontrolle des Geräts auf „Aus“ stellen. Bei Geräten der ABI-Serie ist zum Beispiel die „Passive Referenz“ auf „Aus“ zu stellen.

4. Ergebnis-Interpretation (Siehe das Handbuch des Geräts für die Einstellungen, die folgende Analyse basiert auf einem Instrument der ABI Serie als Beispiel)

4.1 Nachdem die Reaktion abgeschlossen ist, werden die Ergebnisse automatisch gespeichert, und die Vervielfältigungskurven der erkannten Ziel-DNA sowie die internen Kontrollen werden getrennt voneinander analysiert.

4.2 Gemäß der Analyse passt die Vervielfältigungsgraphik den Startwert, Endwert und den Schwellwert der Baseline an (Benutzer können die Werte gemäß der tatsächlichen Situation anpassen. Der Startwert kann zwischen 3-15, der Endwert zwischen 5-20 eingestellt werden; Benutzer können die Vervielfältigungskurve der Negativkontrolle anpassen, damit sie linear oder unterhalb der Schwellwert-Linie verläuft). Auf „Analysieren“ klicken, um die Analyse durchzuführen, die Parameter sollten den folgenden Anforderungen gemäß „Abschnitt 5. Qualitätskontrolle“ entsprechen. Schließlich wird das qualitative Ergebnis im Trägerfenster eingetragen.

5. Qualitätskontrolle

5.1 COVID-19 PCR Negativkontrolle:

Vor dem Ct-Wert 35 dürfte keine Vervielfältigung bei den FAM-, HEX-Kanälen & der internen Kontrolle (ROX-Kanal) zu beobachten sein. Wenn eine falsch positive Vervielfältigung bei einem Kanal zu den Reaktionen der No Template Control (NTC) auftritt, kann es zu einer Kontamination gekommen sein, sodass ein wiederholter Test empfohlen wird.

5.2 COVID-19 PCR Positivkontrolle:

Die FAM-, HEX-Kanäle & die interne Kontrolle (ROX-Kanal) zeigen Ct ≤ 35

5.3 Interne Kontrolle (R NaseP):

Die Kanäle zur internen Kontrolle (ROX) zeigen Ct ≤ 35

5.4 Die vorstehenden Kriterien müssen gleichzeitig im gleichen Experiment erfüllt sein. Ansonsten ist das Experiment ungültig und muss wiederholt werden

Kontrolle	Qualitätskontrolle		
	ORF1ab-Gen (FAM)	Nukleoprotein N-Gen (HEX)	Interne Kontrolle (ROX)
Negativkontrolle	Kein Ct-Wert oder Ct > 35.	Kein Ct-Wert oder Ct > 35.	Kein Ct-Wert oder Ct > 35.
Positivkontrolle	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35
Interne Kontrolle (R NaseP)	-	-	Ct ≤ 35

Hinweis: Diese Anordnung durchläuft 40 Zyklen, allerdings liegt Ct, der Schwellwert zum Cutoff-Zyklus für jede Interpretation, bei 35

Ergebnisanalyse:

1. Zunächst ist die Vervielfältigungskurve der internen Kontrolle im ROX-Kanal zu überprüfen. Wenn Ct ≤ 35, heißt das, dass der Nachweis gültig ist, und die Benutzer können mit den nachfolgenden Analysen fortfahren:

- Wenn vom FAM- und HEX-Kanal eine typisch S-förmige (sigmoidale) Vervielfältigungskurve mit Ct ≤ 35 gezeigt wird, ist das Ergebnis zum COVID-19-Virus positiv.
- Wenn die FAM- und HEX-Kanäle keine typisch S-förmige (sigmoidale) Vervielfältigungskurve (kein Ct) oder Ct > 35 zeigen, ist das Ergebnis zum COVID-19-Virus negativ.
- Wenn die FAM und HEX-Kanäle beide eine typisch S-förmige (sigmoidale) Vervielfältigungskurve mit Ct ≥ 36 und ≤ 40 zeigen, sollte die Probe als verdächtig bewertet werden. Das Experiment sollte vom Benutzer wiederholt werden. Wenn die Ct-Werte bei der Wiederholung im Gleichen Ct-Bereich erscheinen, ist die Probe als wahrscheinlich positiv zu bewerten.
- Der Ct-Cut-off für jeden fluoreszierenden Kanal ist nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

Ziel	Ct - Wert	Interpretation
ORF1ab-Gen (FAM)	Ct≤35	2019-nCov ORF1ab-Gen positiv
Nucleoprotein N-Gen (HEX)	Ct≤35	2019-nCov Nucleoprotein N-Gen positiv
Interne Kontrolle (ROX)	Ct≤35	Interne Kontrolle positiv

Die Gültigkeit und Interpretation aller Probenresultate gemäß den Ergebnissen aus jedem Kanal werden nachfolgend in tabellarischer Form dargestellt.

ORF 1ab - Gen (FAM)	Nukleoprotein N-Gen (HEX)	Interne Kontrolle (ROX)	Ergebnis-Interpretation	Weitere Maßnahmen
Positiv	Positiv	Positiv	SARS-CoV-2 positiv	Versand des Ergebnisses an den Einsender und die zuständigen Gesundheitsbehörden.
Positiv	Negativ	Positiv	Verdächtig. Erneuter Test erforderlich	Wenn N-Gen wiederholt negativ, ist die Interpretation positiv
Negativ	Positiv	Positiv	SARS-CoV-2 negativ	Wenn die FAM-Kurve nicht linear verläuft, verdächtig und erneuter Test erforderlich. Wenn ORF1ab-Gen wiederholt negativ, mögliche Infektion mit anderem Corona-Virus.
Negativ	Negativ	Positiv	SARS-CoV-2 negativ	Mitteilung Ergebnis an Einsender
Negativ	Negativ	Negativ	Ungültig	Probe sollte mit frischer Extraktion wiederholt werden. Wenn ein zweiter Fehler auftritt, ist dies dem Einsender unter Angabe des ungültigen Tests mitzuteilen, und es wird eine erneute Probennahme empfohlen, wenn dies beim Patienten klinisch immer noch angezeigt ist.

Bei negativen Proben sollte die interne Kontrolle positive sein. Bei einem negativen Ergebnis der internen Kontrolle ist das Testergebnis ungültig. Die Ursache sollte gefunden und beseitigt werden. Die Benutzer sollten die Probennahme und das Experiment wiederholen. (Wenn das Ergebnis des zweiten Tests ebenfalls ungültig ist, bitte den Hersteller kontaktieren.)

4. Bestimmung von Ergebnissen in der Grauzone: Wenn das Fluoreszenz-Signal einer Probe in den FAM- und HEX-Kanälen deutlich ansteigt, aber der Ct-Wert größer als 40 ist, handelt es sich um ein Ergebnis in der Grauzone, das erneut untersucht werden muss. Wenn das Ergebnis erneut in der Grauzone liegt, wird der Test als positiv bewertet.

Einschränkungen bei den Bestimmungsmethoden:

1. Die Testergebnisse aus diesem Set dienen ausschließlich als klinische Referenz. Die klinische Diagnose und die Behandlung von Patienten sollte in der Gesamtschau ihrer Symptome, Anamnese, weiterer Laboruntersuchungen und dem Ansprechen auf die Behandlung erfolgen.

2. Analyse zur Möglichkeit von falsch positiven & negativen Ergebnissen:

2.1 Wenn die Probennahme, Verarbeitung & Transport unangemessen waren und die Probenkonzentration gering ist, können dadurch falsch negative Ergebnisse verursacht werden.

2.2 Abweichungen in der Zielsequenz des neuartigen Coronavirus (COVID-19) oder aus anderen Gründen verursachte Sequenzänderungen können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

2.3 Eine unangemessene Aufbewahrung der Reagenzien kann zu falsch negativen Ergebnissen führen.

2.4 Andere, bisher nicht nachgewiesene Interferenzen oder PCR-Inhibitoren können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

2.5 Eine Kreuzkontaminierung während der Probenverarbeitung kann zu falsch positiven Ergebnissen führen.

2.6 Diese Versuchsanordnung sollte gemäß den Vorgaben der guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt werden. Bei der Durchführung des Tests sind die Herstelleranweisungen zu befolgen.

Leistungsdaten zum Produkt:

Klinische Sensitivität und Spezifität:

1. Es sind 20 Stück SARS-COV-2 positive Proben (mit einer gleichmäßigen Verteilung der Proben mit niedrigen, mittleren und hohen Ct-Werten) sowie 75 Stück SARS-COV-2 negative Proben getestet worden.

2. Es sind 10 Stück Proben getestet worden, die für andere Viren positiv und SARS COV-2 negativ waren, ohne dass eine Kreuzreaktion festgestellt wurde, d. h. humanes Coronavirus, Influenza A-Virus, Influenza B-Virus, respiratorisches Synzytial-Virus, Adenovirus, Parainfluenza-Virus, Streptococcus pneumoniae,

Haemophilus influenza, Pseudomonas aeruginosa, Pertussis,

Übersetzung der Legende:

Verwendete Symbole auf den Etiketten von Meril Diagnostics:

Catalogue No. = Katalog-Nr.

Manufacturer = Hersteller

Manufacturing Date = Produktionsdatum

Storage Temperature = Lagertemperatur

In vitro Diagnostics = In vitro-Diagnose

Batch no. = Charge-Nr.

Expiry Date = Verwendbar bis-Datum

Keep Dry = Trocken lagern

Sufficient for = Ausreichend für

Authorized European Representative in the European Community = In der Europäischen Gemeinschaft niedergelassener Bevollmächtigter

Consult instruction for use = Zur Verwendung die Anleitung beachten

Caution = Achtung

Keep away from direct sunlight = Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen

Do not use if box open or damaged = Nicht verwenden, falls Schachtel bereits geöffnet oder beschädigt

European health & safety product label = Europäisches Produktkennzeichen für Gesundheit & Sicherheit

Hinweis: Wenn die Zielgen-Signale (FAM, HEX) zu stark sind, kann die interne Kontrolle (ROX) u. U. negativ sein.

2. Wenn der ROX-Kanal zur internen Kontrolle keinen Ct oder Ct > 35 erkannt hat, ist dies ein Anzeichen dafür, dass die Konzentration der getesteten Probe zu gering ist und die Reaktion von der behindernden Substanz gehemmt wird. Die Benutzer müssen das Experiment wiederholen.

3. Bei positiven Proben und Virenkulturen besteht keine Anforderung an die Ergebnisse der internen Kontrolle.