

MutaPLEX[®] Coronavirus

Real-Time-RT-PCR-Kit

Für den simultanen In-vitro-Nachweis der RNA des neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) und Untergattung Sarbecovirus (SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2) extrahiert aus biologischen Proben

For the simultaneous in vitro detection of RNA of novel coronavirus (SARS-CoV-2) and Subgenus Sarbecovirus (SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2), extracted from biological specimens

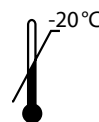
Gültig ab / Valid from 2020-12-04



**KG192696
KG1926-384
KG1926-768**



96/384/
768



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	2
2	EINLEITUNG	2
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	3
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	4
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
8	PROBENMATERIAL	5
9	PROBENVORBEREITUNG	5
10	KONTROLL-RNA	6
11	REAL-TIME-RT-PCR	6
	11.1 Wichtige Hinweise vor Beginn	6
	11.2 Durchführung	7
	11.3 Geräteeinstellungen	8
12	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	10
13	VALIDIERUNGSDATEN	13
14	EINSCHRÄNKUNGEN	14
15	PROBLEMBEHANDLUNG	15
16	LEISTUNGSDATEN	17
	16.1 Analytische Sensitivität	17
	16.2 Analytische Spezifität	17
	16.3 Klinische Proben	19
	16.4 Linearität	20
	16.5 Präzision	22
	16.6 Diagnostische Sensitivität	23
17	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	23
18	LITERATUR	24

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit ist ein Screening-Test für den simultanen Nachweis der RNA des neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) und der Untergattung Sarbecovirus (SARS assoziierter Betacoronavirus: SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2) extrahiert aus biologischen Proben.

2 EINLEITUNG

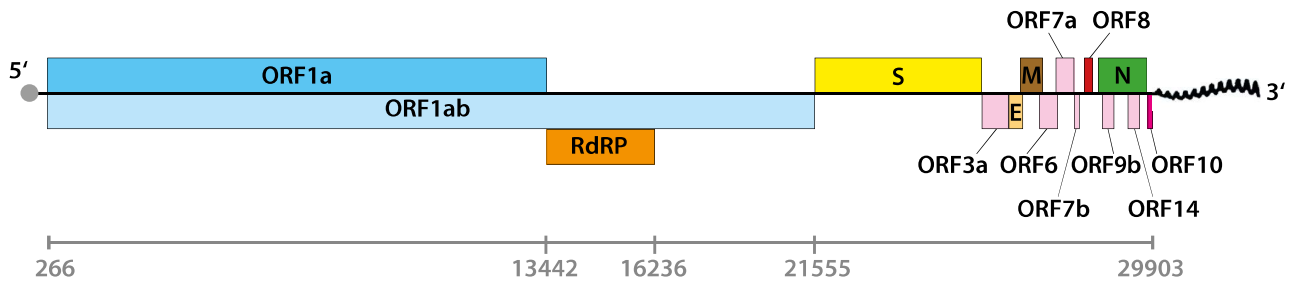
Coronaviren (CoV) sind eine große Virusfamilie, die Erkrankungen verursachen von der einfachen Erkältung bis hin zu schwereren Erkrankungen wie das Middle East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) und das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS-CoV). Der neuartige Coronavirus (SARS-CoV-2) ist ein neuer Stamm, der kürzlich im Menschen nachgewiesen wurde (in Europa erstmalig im Februar 2020) und die Lungenkrankheit COVID-19 verursacht.

Coronaviren sind zoonotisch, das heißt sie werden zwischen Menschen und Tieren übertragen. Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass SARS-CoV von Zibetkatzen auf Menschen und MERS-CoV von Dromedaren auf Menschen übertragen wurden. Einige bekannte Coronaviren zirkulieren in Tieren und haben bis jetzt noch keine Menschen infiziert.

Häufige Infektionsanzeichen schließen respiratorische Symptome, Fieber, Husten, Kurzatmigkeit und Atmungsschwierigkeiten ein. In schwereren Fällen kann die Infektion Lungenentzündung, das schwere akute respiratorische Syndrom, Nierenversagen und sogar den Tod verursachen. Standardempfehlungen zur Verhinderung der Verbreitung von Infektionen beinhalten regelmäßiges Händewaschen, das Bedecken von Mund und Nase beim Husten und Niesen sowie das Durchgaren von Fleisch und Eiern. Es ist der Kontakt mit jedem zu vermeiden, der Symptome respiratorischer Erkrankungen wie Husten und Niesen zeigt.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit enthält spezifische Primer und zweifach markierte Proben für die Amplifikation der RNA (cDNA) von SARS-CoV-2 (sowohl RdRP-Gen (RNA-dependent RNA polymerase) als auch S-Gen (Spike-Protein) im FAM-Kanal) und der RNA (cDNA) der Untergattung Sarbecovirus (SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2, E-Gen (Envelope-Protein) im Cy5-Kanal) extrahiert aus biologischen Proben. Sowohl das E-Gen als auch das RdRP-Gen sind Zielsequenzen des von der WHO empfohlenen Virusgenoms. Die simultane Detektion von 3 Zielsequenzen (RdRP-Gen, S-Gen und E-Gen) erhöht die diagnostische Sicherheit auch im Fall von Mutationen der Zielsequenz.



Schematische Darstellung: Zielgenregion des MutaPLEX® Coronavirus Real-Time-RT-PCR-Kit.

Das Vorhandensein von Nukleinsäuren wird durch eine ansteigende Fluoreszenz detektiert infolge der Hydrolyse der Proben während der Amplifizierung. Die Fluoreszenz der RdRP-Gen-spezifischen Proben wird im FAM-Kanal gemessen. Das Fluoreszenzsignal der Amplifikation der E-Gen-spezifischen Proben werden im Cy5-Kanal gemessen.

Zusätzlich enthält der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit eine Kontroll-RNA (Interne Prozess Kontrolle, IPC), die während der RNA-Extraktion zugegeben und in der gleichen Reaktion durch eine HEX-markierte Porbe detektiert wird. Die Kontroll-RNA erlaubt den Nachweis der RT-PCR-Inhibition und fungiert als Kontrolle dafür, dass die Nukleinsäure von der biologischen Probe isoliert wurde.

Der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit enthält zusätzlich eine interne System-Kontrolle (ISC). Die ISC besteht aus Primern und Proben für die Detektion des Haushaltgens (Beta-Actin, artenübergreifend) im Eluat von biologischen Proben. Die ISC hilft falsch negative Ergebnisse zu verhindern, die durch Fehler bei Probennahme und Transport entstehen. Die Amplifizierung der Beta-Actin-Zielsequenz wird im ROX-Kanal gemessen.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG192696), 384 (KG1926-384) oder 768 (KG1926-768) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt		
		96	384	768
Reaktionsmix	gelb	1 x 1325 µl	4 x 1325 µl	8 x 1325 µl
Enzym	blau	1 x 19.2 µl	1 x 76.8 µl	2 x 76.8 µl
Positive Kontrolle	rot	1 x 150 µl	1 x 300 µl	1 x 300 µl
Negative Kontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 300 µl	1 x 300 µl
Kontroll-RNA	transparent	1 x 480 µl	2 x 960 µl	4 x 960 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- RNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023 bzw. KG1024)
- Wasser, geeignet für PCR-Anwendung
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-Time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel oder Platten mit Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -20°C zu lagern. Bis zu 20 Frier-Auftau-Zykeln sind möglich. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei 2–8°C haltbar.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.

- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmalschutzhandschuhe zu tragen
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.
- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierte Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) RT-PCR-Kit ist RNA, die aus biologischen Proben (z. B. Abstrichen, Speichelproben) isoliert wurde.

9 PROBENVORBEREITUNG

Zur RNA-Isolierung wird die Verwendung kommerziell erhältlicher Extraktionskits empfohlen wie MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023 bzw. KG1024).

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

Ein Vergleich der Amplifikation der Kontroll-RNA in den Proben mit der Amplifikation der internen Kontrolle in der Wasserkontrolle erlaubt Einblicke in mögliche In-

hibitionen der Real-Time-RT-PCR. Des Weiteren werden mögliche Kontaminationen während der Nukleinsäureextraktion aufgedeckt.

Beachten Sie bitte auch Kapitel 10 (Kontroll-RNA).

Falls die Real-Time-RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die Nukleinsäureextrakte entsprechend den Angaben des Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

10 KONTROLL-RNA

Der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit enthält eine Kontroll-RNA, die zum einen als RNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-Time-RT-PCR aufzeigt.

a) Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle

MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Kontroll-RNA zur RNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-RNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die RNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-Time-RT-PCR nach Protokoll A an.

Die Kontroll-RNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

b) Kontroll-RNA als interne Kontrolle der Real-Time-RT-PCR

Sollte keine Kontrolle der RNA-Extraktion gewünscht sein, setzen Sie die Real-Time-RT-PCR nach Protokoll B an.

11 REAL-TIME-RT-PCR

11.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“).
- Bevor Sie die RT-PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-Time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die RT-PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem RT-PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Vor jedem Gebrauch müssen alle Reagenzien aufgetaut, gemischt und kurz anzentrifugiert werden.

- Wegen der hohen Viskosität des Enzyms (blauer Deckel) wird ein 15 minütiges Vorwärmen bei Raumtemperatur empfohlen.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8°C) oder auf Eis zu kühlen.

11.2 Durchführung

Falls die Kontroll-RNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-Time-RT-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

Protokoll A

Die Kontroll-RNA wurde bereits zur RNA-Extraktion zugegeben (siehe Kapitel 10 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält außer der Probe alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mixes (Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

Protokoll B

Die Kontroll-RNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-Time-RT-PCR verwendet (siehe Kapitel 10 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten RT-PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mixes (die Kontroll-RNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Kontroll-RNA *	0,2 µl x (N+1)*

* Die durch Zugabe der Kontroll-RNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

Protokoll A und B: Ansetzen der Real-Time-RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-Time-PCR-Geräts stellen bzw. optische PCR-Reaktionsplatte verwenden.
- **14 µl** des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- **6 µl** der RNA-Eluate (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße bzw. Vertiefungen der Platte pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-Time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

11.3 Geräteeinstellungen

Nutzen Sie für die Real-Time-RT-PCR das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil.

Tabelle 5: Real-Time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	40 s	60 °C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		

Abhängig vom verwendeten Real-Time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-Time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen																
LightCycler 480II	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	465–510 533–580 533–610 618–660	Colour Compensation Kit CoV-2 (KG19-4-CC) wird benötigt <table border="1"> <thead> <tr> <th>Melt factor</th> <th>Quant factor</th> <th>Max integration time (s)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>		Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)	1	10	1	1	10	2	1	10	2	1	10	3
Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)																	
1	10	1																	
1	10	2																	
1	10	2																	
1	10	3																	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	FAM HEX ROX Cy5	Gain 8 Gain 1 Gain 1 Gain 4	Reference Dye: None															
ABI 7500	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	FAM JOE ROX Cy5	Option Reference Dye ROX: NO																
AriaMx Bio-Rad CFX96	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	FAM HEX ROX Cy5	Option Reference Dye ROX: NO																
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	grün gelb orange rot	Gain 5 Gain 5 Gain 5 Gain 5	Outlier removal NTC threshold: 15%															
Mic qPCR Cycler	RdRP-Gen / S-Gen Kontroll-RNA (IPC) ISC E-Gen	grün gelb orange rot	Gain 8 Gain 10 Gain 10 Gain 10																

12 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die folgenden Ergebnisse können auftreten (Tabelle 7):

Tabelle 7: Interpretation Reaktionsmix

Signal/ C _T -Werte				Interpretation
FAM-Kanal	Cy5-Kanal	ROX-Kanal	HEX-Kanal	
RdRP-Gen S-Gen	E-Gen	ISC	Kontroll-RNA (IPC)	
positiv	negativ	positiv oder negativ	positiv oder negativ**	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2-RNA.
positiv	positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ**	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2-RNA.
negativ	positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ**	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2 RNA oder SARS-CoV-1 RNA*.
negativ	negativ	positiv	≤ 34***	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder SARS-CoV-2 RNA noch SARS-CoV-1 RNA.
negativ	negativ	negativ	≤ 34***	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Menge oder Qualität des Probenmaterials unzureichend.
negativ	negativ	positiv	negativ oder > 34***	Achtung! Entweder wurde die Real-Time-RT-PCR inhibiert oder es traten Fehler bei der RNA- / DNA-Extraktion auf.

Signal/ C _T -Werte				Interpretation
FAM-Kanal	Cy5-Kanal	ROX-Kanal	HEX-Kanal	
RdRP-Gen S-Gen	E-Gen	ISC	Kontroll-RNA (IPC)	
negativ	negativ	negativ	negativ oder > 34***	Achtung! Entweder wurde die Real-Time-RT-PCR inhibiert oder es traten Fehler bei der RNA-/DNA-Extraktion auf oder Menge oder Qualität des Probenmaterials unzureichend.

* SARS-CoV-1-Infektionen wurden seit 2004 [5] nicht mehr gemeldet.

** Ein starkes positives Signal im FAM-, Cy5- und/oder ROX-Kanal kann die interne Kontrolle inhibieren. In solchen Fällen kann das Ergebnis der Kontroll-RNA vernachlässigt werden.

*** Die C_T-Werte verschieben sich ggf. je nach verwendetem PCR-Gerät und/oder der verwendeten Extraktionsmethode. Die Wasserkontrolle kann als Referenz verwendet werden. Falls der C_T-Wert im HEX-Kanal stark von dem der Wasserkontrolle abweicht, liegt eine teilweise Inhibition vor, die im Falle schwach positiver Proben zu einem falsch negativen Ergebnis führt.

Die **Abbildungen 1, 2, 3** und **4** zeigen Beispiele für positive und negative Real-Time-RT-PCR-Ergebnisse.

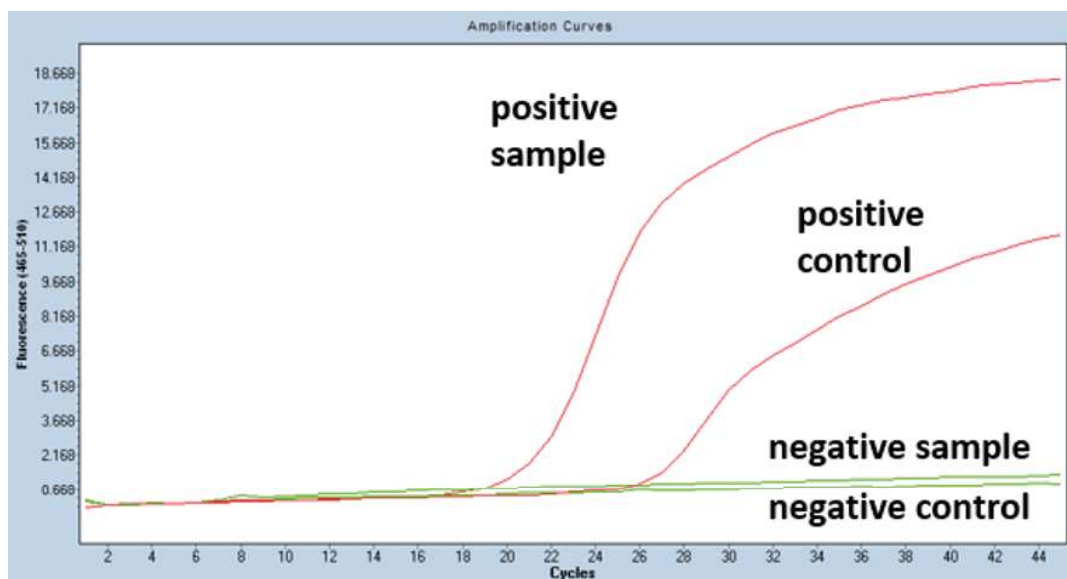


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine pathogene spezifische Amplifikation im FAM-Kanal (positive Probe und positive Kontrolle), während bei der negativen Probe und der negativen Kontrolle kein Fluoreszenzsignal detektiert wird (LC480 II Real-Time-PCR-Gerät).

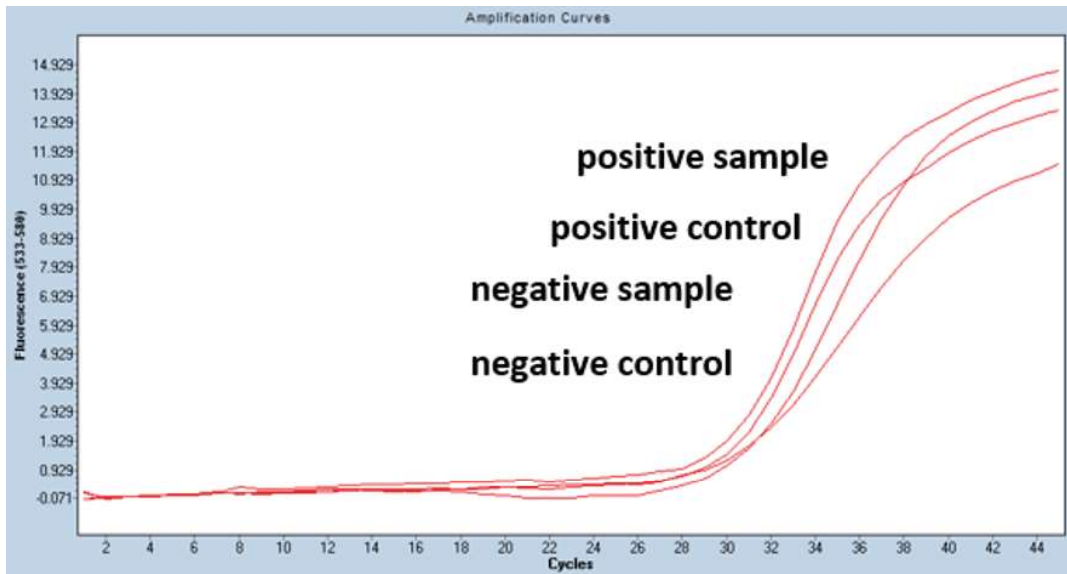


Abb. 2: Sowohl die positive Probe und Kontrolle als auch die negative Probe und Kontrolle zeigen ein Signal im Kontroll-RNA-spezifischen HEX-Kanal (IPC). Das Amplifikationssignal der Kontroll-RNA der negativen Probe zeigt, dass die fehlenden Signale in den pathogenspezifischen Kanälen FAM und Cy5 nicht von einer RT-PCR-Inhibition oder fehlerhafter RNA-Isolierung verursacht werden, sondern dass die Probe eine echte Negative ist (LC480 II Real-Time-PCR-Gerät).

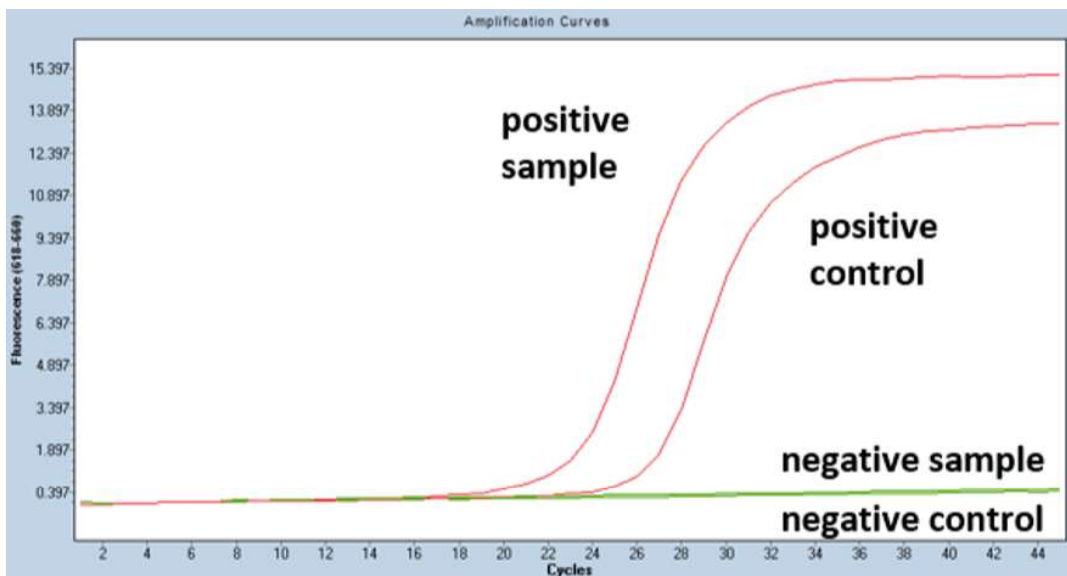


Abb. 3: Die positive Probe zeigt eine pathogenspezifische Amplifikation im Cy5-Kanal (positive Probe und Kontrolle), während kein Fluoreszenzsignal für die negative Probe und Kontrolle detektiert wird (LC480 II Real-Time-PCR-Gerät).

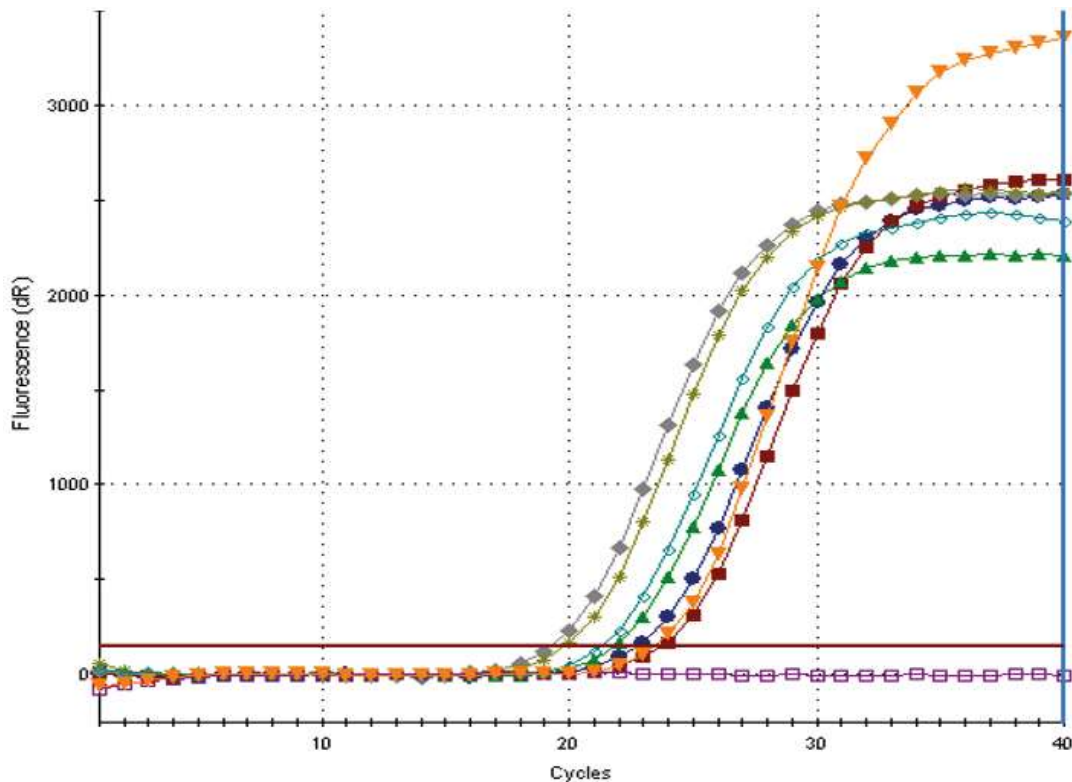


Abb. 4: Signale der Amplifikation von ISC im ROX-Kanal. Die Abbildung zeigt die C_T -Werte der Eluate von Abstrichen der Atemwege nach der Nukleinsäureextraktion mit MutaCLEAN® Mag RNA/ DNA extraction Kit (KG1023); Stratagene Mx3005 P Real-Time-PCR-Gerät.

13 VALIDIERUNGSDATEN

Um die Sicherheit dieses Tests zu erhöhen, beinhalten die negative und positive Kontrolle eine IPC.

Negative Kontrolle

Die negative Kontrolle darf keinen C_T im FAM- und Cy5-Kanal zeigen. Der HEX-Kanal (IPC) zeigt mit der negativen Kontrolle einen C_T -Wert < 34 . Durch die hohe Sensitivität des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits kann ein schwaches positives Ergebnis im ROX-Kanal (ISC) durch leichte Kontaminationen mit humaner DNA während des RT-PCR-Ansatzes nicht komplett ausgeschlossen werden. Dies beeinflusst nicht die Validität des entsprechenden Testansatzes (siehe auch „Interne Kontrollen“).

Positive Kontrolle

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve in den Kanälen FAM, Cy5, ROX und HEX aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen C_T -Wert von 30 fallen außer für den HEX-Kanal, der einen C_T -Wert < 34

haben muss. Die positive Kontrolle enthält in-vitro-Transkriptionen und synthetische DNA von etwa 10^4 Kopien pro Reaktion für das RdRP-Gen, S-Gen, E-Gen und ISC.

Interne Kontrollen

Alle internen Kontrollen (ISC und IPC, seqc-Probe und Extraktionsqualitätskontrolle) müssen eine positive, d. h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der C_T -Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der C_T -Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein RNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Es wird empfohlen, eine Wasserkontrolle bei jedem Lauf mitzuführen. Die IPC in dieser Wasserkontrolle muss unter einen C_T -Wert von 34 fallen. Bei korrekt abgenommenen Abstrichen weist die ISC C_T -Werte von ca. 15 bis ca. 28 auf. Ein stark verzögertes Signal, das einen C_T -Wert von über 34 hat, weist auf eine geringe Probenmenge hin. Daher können falsch negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Falls weder im FAM- noch im Cy5-Kanal Amplifikation auftritt, muss eine Amplifikationskurve im ROX-Kanal (ISC) und dem HEX-Kanal (IPC) auftreten, wenn Eluate von Primärproben multipler Spezies (z. B. Säugetiere und Vögel) verwendet wurden.

Wenn andere Kits zur Nukleinsäureextraktion verwendet wurden, muss der Kunde eigen Cut-Offs definieren. In diesem Fall sollte der C_T -Wert der Kontroll-RNA (IPC) im Eluat einer Probe um nicht mehr als 4 C_T verzögert sein im Vergleich zum Eluat einer Wasserkontrolle.

14 EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der Guten Laborpraxis (*Good Laboratory Practice*) sind bei der Durchführung dieses Assays einzuhalten.
- Alle Reagenzien auf Verunreinigungen und Kontamination genau überprüfen. Alle verdächtigen Reagenzien sollten entsorgt werden.
- Dieser Test kann nicht direkt mit biologischen Proben verwendet werden. Geeignete Extraktionsmethoden für Nukleinsäure müssen vor der Anwendung dieses Test durchgeführt werden.

- Die Anwesenheit von RT-PCR Inhibitoren kann falsch negative oder ungültige Resultate verursachen.
- Potentielle Mutationen in den Zielregionen deS-Genoms des neuartigen CoV und der Betacoronaviren, die durch den Primer und/oder in dem Kit verwendete Proben verdeckt sind, können die Detektion der entsprechenden RNA verhindern.
- Wie bei allen diagnostischen Tests müssen die Resultate des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits unter Einbezug aller Ergebnisse aus Klinik und Labor interpretiert werden.

15 PROBLEMBEHANDLUNG

Folgende Problembeschreibung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-Time-RT-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik AG.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM- oder Cy5-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der nCoV-spezifischen RNA-Amplifikation, den Cy5-Kanal für die Amplifikation der betacoronavirusspezifischen RNA, den HEX-Kanal für die Kontroll-RNA und den ROX-Kanal für die Amplifikation der ISC.

Fehlerhaftes Ansetzen des Master-Mix

Stellen Sie sicher, dass das Enzym zum Master-Mix hinzugefügt wird (Kapitel 11).

Fehlerhaftes Ansetzen der Real-Time-RT-PCR

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

Fehlerhaftes Temperaturprofil

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-Etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im virusspezifischen FAM- oder Cy5-Kanal

Die Real-Time-RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein

Überprüfen Sie die Real-Time-RT-PCR-Bedingungen (Kapitel 11).

Real-Time-RT-PCR-Inhibition

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden.

Probenmaterial nicht ausreichend

Stellen Sie sicher, dass ausreichend viel Probenmaterial für die Extraktion verwendet wurde. Verwenden Sie eine angemessene Isolationsmethode (s. Kapitel „Probenvorbereitung“) und befolgen Sie die Anweisungen des Kitherstellers.

Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses

Falls die Kontroll-RNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-Etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM-, und/oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle

Kontamination des Real-Time-RT-PCR-Ansatzes

Wiederholen Sie die Real-Time-RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-Time-RT-PCR mit einem neuen Kit.

Detektion eines Fluoreszenz-Signals im ROX-Kanal der negativen Kontrolle

Kontamination des Real-Time-RT-PCR-Ansatzes

Solange der ROX-Kanal sehr hohe C_T -Werte zeigt ist die Kontamination vernachlässigbar.

Der PCR Lauf ist immer noch valide für die Detektion von SARS-CoV-2, wenn der FAM- und der Cy5-Kanal negativ mit der negativen Kontrolle ist.

16 LEISTUNGSDATEN

16.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (*limit of detection*, LoD) des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits wurde anhand serieller Verdünnungsstufen von synthetischen RNA-Fragmenten mit den nCoV-Zielsequenzen sowie der Betacoronavirus-Zielsequenz in einem Stratagene Mx3005 Real-Time-PCR-Gerät bestimmt.

Die LoD des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits beträgt ≤ 10 Genomkopien pro Reaktion.

16.2 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits wurde durch in-silico-Analysen und die Amplifikation anderer in klinischen Proben vorkommender relevanter Viren und Bakterien bestimmt.

Der MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kit ergab positive Ergebnisse für die Proben, die die RNA von SARS-CoV-2- und Betacoronavirus-RNA-Sequenzen enthielten, wohingegen Proben mit anderen Pathogenen zuverlässig als negativ bewertet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Für die Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits verwendete bakterielle und virale Pathogene

Eluat mit bekannten Erregern	Erwartetes Ergebnis für E-Gen	Erwartetes Ergebnis für RdRP-Gen / S-Gen	MutaPLEX® Coronavirus E-Gen	MutaPLEX® Coronavirus RdRP-Gen / S-Gen
	Cy5-Kanal	FAM-Kanal	Cy5-Kanal	FAM-Kanal
SARS-CoV-2	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
SARS-CoV-1	<i>positiv</i>	negativ	<i>positiv</i>	negativ
MERS-CoV	negativ	negativ	negativ	negativ

Eluat mit bekannten Erregern	Erwartetes Ergebnis für E-Gen	Erwartetes Ergebnis für RdRP-Gen / S-Gen	MutaPLEX® Coronavirus E-Gen	MutaPLEX® Coronavirus RdRP-Gen / S-Gen
	Cy5-Kanal	FAM-Kanal	Cy5-Kanal	FAM-Kanal
HCoV-229E	negativ	negativ	negativ	negativ
HCoV-OC43	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenza A H3N2	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenza A H5N1	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenzavirus B	negativ	negativ	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	negativ	negativ	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus B	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenza-virus 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenza-virus 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenza-virus 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenza-virus 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Metapneumovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Adenovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Rhinoviruses	negativ	negativ	negativ	negativ
Enteroviruses	negativ	negativ	negativ	negativ
Human Bocavirus	negativ	negativ	negativ	negativ

Eluat mit bekannten Erregern	Erwartetes Ergebnis für E-Gen	Erwartetes Ergebnis für RdRP-Gen / S-Gen	MutaPLEX® Coronavirus E-Gen	MutaPLEX® Coronavirus RdRP-Gen / S-Gen
	Cy5-Kanal	FAM-Kanal	Cy5-Kanal	FAM-Kanal
Legionella pneumophila	negativ	negativ	negativ	negativ
Mycoplasma pneumophila	negativ	negativ	negativ	negativ
Mycobacterium tuberculosis complex	negativ	negativ	negativ	negativ
Bordetella pertussis	negativ	negativ	negativ	negativ
Bordetella parapertussis	negativ	negativ	negativ	negativ
S. aureus	negativ	negativ	negativ	negativ
MRSA	negativ	negativ	negativ	negativ
MSSA	negativ	negativ	negativ	negativ
Streptococcus spp.	negativ	negativ	negativ	negativ

16.3 Klinische Proben

Positive (50) und negative (153) bestätigte Proben (orale und nasale Abstriche) des Ausbruchs der Pandemie in Europa von 2020 wurden getestet.

Die RNA wurde mit dem MutaCLEAN® Mag RNA/DNA Extractions-Kit (KG1023) mit einem KingFisher Prime-Duo-Gerät (bzw. Biocomma M32) extrahiert.

Die PCR-Tests wurden mit einem MX3005p Stratagene Cyler durchgeführt. Der Rest der bestätigten Proben mit dem MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) zeigte eine Sensitivität und eine Spezifität von je 100%. Keine der Proben wurde in der PCR inhibiert.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® Coronavirus positiv	50	0
MutaPLEX® Coronavirus negativ	0	153
	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
	100	100

16.4 Linearität

Der lineare Messbereich des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kits wurde durch die Analyse logarithmischer Verdünnungsreihen von *In-vitro*-Transkripten und synthetischer RNA-Fragmente ermittelt.

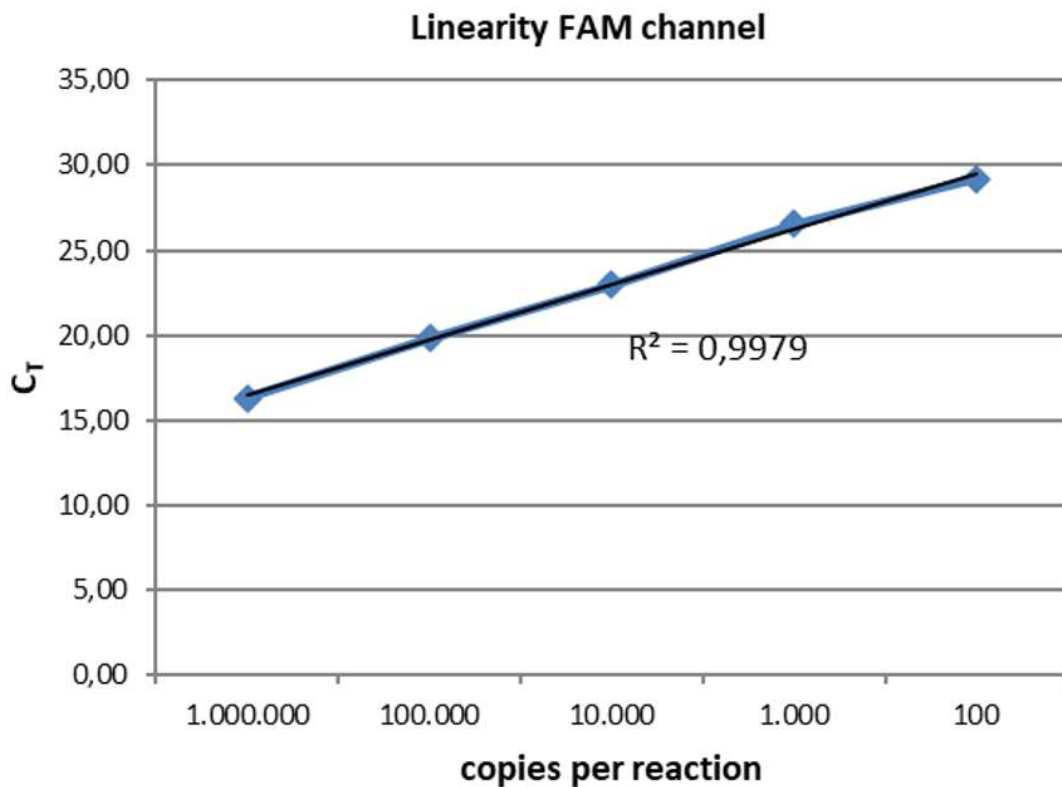


Abb. 5: Bestimmung des linearen Messbereichs des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits im FAM-Kanal.

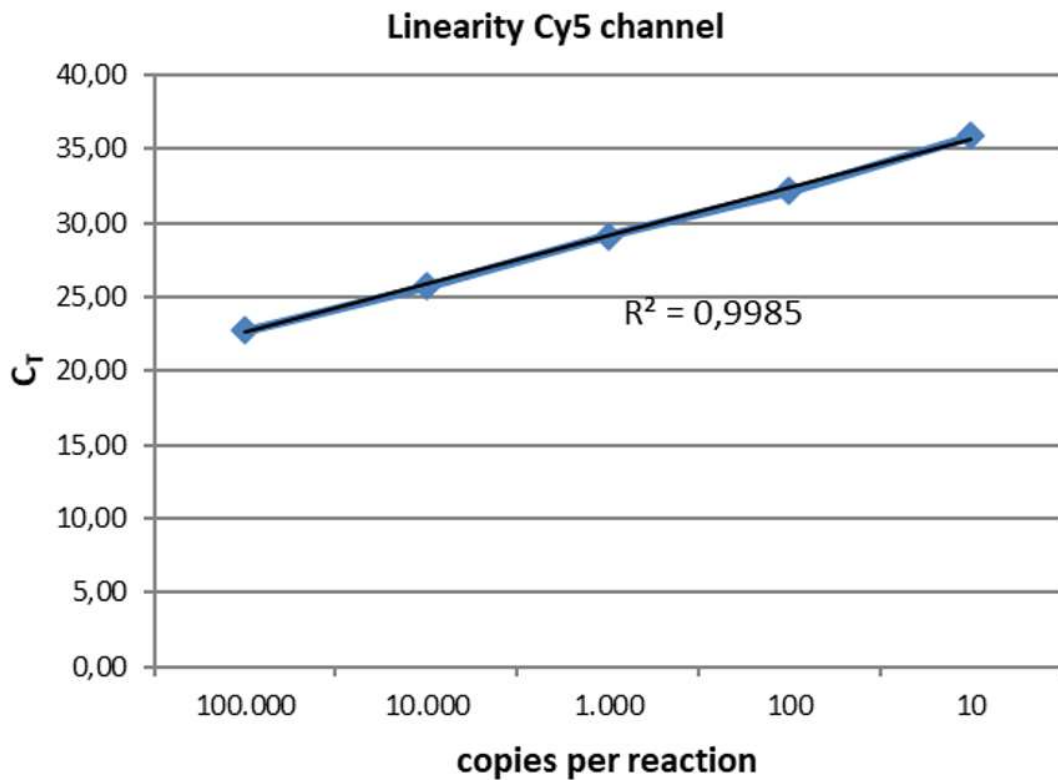


Abb. 6: Bestimmung des linearen Messbereichs des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits im Cy5-Kanal.

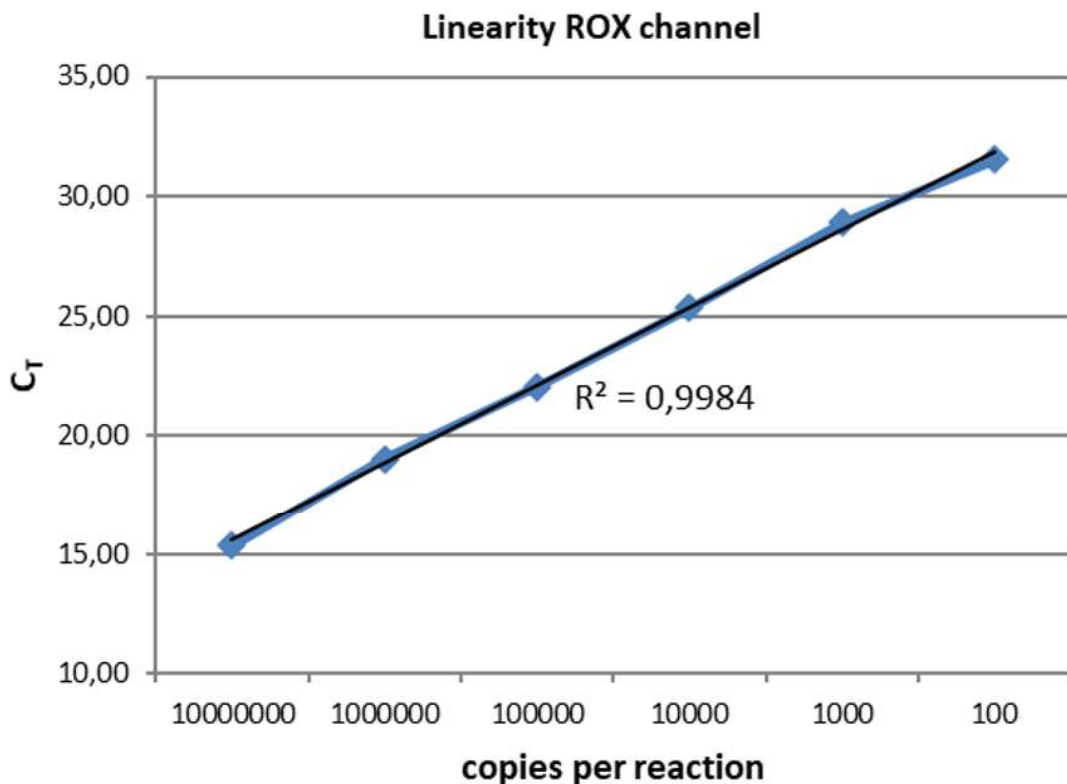


Abb. 7: Bestimmung des linearen Messbereichs des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits im ROX-Kanal.

16.5 Präzision

Die Präzision des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits wurde als Intra-Assay-Variabilität, Inter-Assay-Variabilität und Chargen-Variabilität bestimmt.

Variabilitätsdaten werden als Standardabweichung und Variationskoeffizient dargestellt. Die Daten basieren auf Quantifizierungsanalysen definierter Konzentrationen von RdRP-Gen in-vitro-Transkriptionen und E-Gen in-vitro-Transkriptionen, ISC-spezifischer DNA und dem Threshold-Cycle der Kontroll-RNA (IPC).

Tabelle 8: Präzision des MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR-Kits.

RdRP-Gen und S-Gen (FAM)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0,23	0,77
Inter-Assay-Variabilität	25	0,51	1,71
Inter-Lot-Variabilität	25	0,76	2,56

E-Gen (Cy5)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0,27	0,84
Inter-Assay-Variabilität	25	0,51	1,50
Inter-Lot-Variabilität	25	0,52	1,61

ISC (ROX)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0,28	0,90
Inter-Assay-Variabilität	25	0,40	1,27
Inter-Lot-Variabilität	25	0,25	0,77

IPC (HEX)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0,69	2,31
Inter-Assay-Variabilität	25	0,58	1,91
Inter-Lot-Variabilität	25	0,37	1,22







16.6 Diagnostische Sensitivität



Die diagnostische Sensitivität des Real-Time-RT-PCR-Assays ist hauptsächlich abhängig von der verwendeten DNA/RNA-Extraktionsmethode zur Isolierung von DNA und RNA aus verschiedenen biologischen Proben. Reagenzien zur DNA/RNA-Extraktion sind nicht Bestandteil des Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR-Kits. Der Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR-Kit enthält eine Extraktions-Kontrolle und Richtlinien für die Validierungskriterien zur Kontrolle der Extraktion in jeder Reaktion. Die Extraktionskontrolle zeigt die Inhibierung des Real-Time-RT-PCR und/oder die fehlerhafte Nukleinsäure-Extraktion an. Sie kann nicht als Kalibrator verwendet werden.

Immundiagnostik AG garantiert die analytische Sensitivität und Spezifität des Real-Time-RT-PCR-Kits, wenn sie mit eluierter DNA und RNA von Referenzmaterialien, Ringversuchproben und mit synthetischen Nukleinsäurefragmenten durchgeführt wurde. Immundiagnostik AG garantiert nicht die diagnostische Sensitivität. Wenn die diagnostische Sensitivität in Arbeitsanleitungen von Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR-Kits angegeben wird, korrelieren die Daten ausschließlich mit der spezifischen Nukleinsäure-Extraktionsmethode, die zur Validierung des entsprechenden Kits verwendet wurde und kann nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragen werden.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders die für biologische Proben verwendete Extraktionsmethode zur DNA/RNA-Isolierung zu qualifizieren.

17 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribo nukleinsäure		Katalognummer
RNA	Ribonukleinsäure		Zu verwenden mit
PCR	Polymerase- Kettenreaktion		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
RT	Reverse Transkription		Obere Temperaturgrenze
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR		Hersteller
nCoV	neuartiges Coronavirus		<i>In-vitro</i> Diagnos- tikum

REACTION MIX	Reaktionsmix		Verwendbar bis
ENZYME	Enzym	LOT	Chargennummer
CONTROL +	Positive Kontrolle	CONT	Inhalt
CONTROL -	Negative Kontrolle		Arbeitsanleitung beachten
CONTROL RNA IPC	Kontroll-RNA (IPC)	E-Gen	Envelope-Gen
RdRP-Gen	RNA-dependent RNA Polymerase-Gen	S-Gen	Spike-Gen

18 LITERATUR

1. www.who.int/health-topics/coronavirus
2. Corman et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time-RTPCR. Eurosurveillance, Volume 25, Issue 3, 23/Jan/2020.
3. www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z, 02/March/2020
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/coronavirus/>
5. <https://www.nhs.uk/conditions/sars/>

MutaPLEX[®] Coronavirus

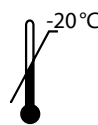
Real-Time-RT-PCR Kit

For the simultaneous in vitro detection of RNA of novel coronavirus (SARS-CoV-2) and subgenus Sarbecovirus (SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2), extracted from biological specimens

Valid from 2020-12-04



KG192696
KG1926-384
KG1926-768



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	27
2	PATHOGEN INFORMATION	27
3	PRINCIPLE OF THE TEST	27
4	PACKAGE CONTENTS	28
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	28
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	29
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	29
8	SAMPLE MATERIAL	30
9	SAMPLE PREPARATION	30
10	CONTROL RNA	30
11	REAL-TIME-RT-PCR	31
	11.1 <i>Important points before starting</i>	31
	11.2 <i>Procedure</i>	31
	11.3 <i>Instrument settings</i>	33
12	DATA ANALYSIS	34
13	ASSAY VALIDATION	37
14	LIMITATIONS OF THE METHOD	38
15	TROUBLESHOOTING	39
16	KIT PERFORMANCE	40
	16.1 <i>Analytical sensitivity</i>	40
	16.2 <i>Analytical specificity</i>	41
	16.3 <i>Clinical samples</i>	43
	16.4 <i>Linear range</i>	43
	16.5 <i>Precision</i>	45
	16.6 <i>Diagnostic Sensitivity</i>	46
17	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	47
18	LITERATURE	47

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR kit is a screening assay for the simultaneous detection of RNA of novel coronavirus (SARS-CoV-2) and the Subgenus Sarbecovirus (SARS related Betacoronavirus: SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2) extracted from biological specimens.

2 PATHOGEN INFORMATION

Coronaviruses (CoV) are a large family of viruses that cause illness ranging from the common cold to more severe diseases such as Middle East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV). The novel Coronavirus (SARS-CoV-2) is a new strain that has been previously identified in humans and causes the pulmonary disease CoViD-19.

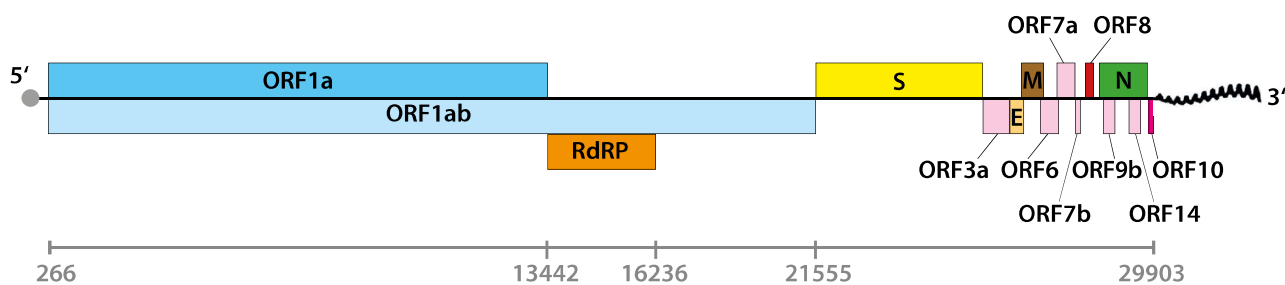
Coronaviruses are zoonotic, meaning they are transmitted between animals and people. Detailed investigations found that SARS-CoV was transmitted from civet cats to humans and MERS-CoV from dromedary camels to humans. Several known Coronaviruses are circulating in animals that have not yet infected humans.

Common signs of infection include respiratory symptoms, fever, cough, shortness of breath and breathing difficulties. In more severe cases, infection can cause pneumonia, severe acute respiratory syndrome, kidney failure and even death.

Standard recommendations to prevent infection spread include regular hand washing, covering mouth and nose when coughing and sneezing, thoroughly cooking meat and eggs. Avoid close contact with anyone showing symptoms of respiratory illness such as coughing and sneezing.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification of RNA (cDNA) of SARS-CoV-2 (both, RdRP gene (RNA-dependent RNA polymerase)and S Gene (spike protein), FAM channel) and the RNA (cDNA) of the Subgenus Sarbecoviruses (SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2, E gene (envelope protein), Cy5 channel) extracted from biological specimens. Both, E gene and RdRP gene are target sequences of the viral genome recommended by the WHO. The simultaneous detection of 3 target sequences (RdRP gene, S Gene and E gene) increases the diagnostic reliability, even in cases of target sequence mutations.



Schematic illustration: target gene region of the MutaPLEX® coronavirus Real-Time-RT-PCR kit.

Furthermore, MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit contains a control RNA (Internal Process Control, IPC), which is added during RNA extraction and detected in the same reaction by a HEX labelled probe.

The control RNA allows the detection of RT-PCR inhibition and acts as control, that the nucleic acid was isolated from the biological specimen.

Additionally, MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit contains an Internal System Control (ISC). The ISC consists of primers and probes for the detection of a housekeeping gene (Beta-actin, multi species) in the eluate from a biological specimen. The ISC helps preventing false negative results due to insufficient sample drawing or transport. The amplification of the Beta-actin target sequence is measured in the ROX channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 96 (KG192696), 384 (KG1926-384), or 768 (KG1926-768) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit .

Label	Lid Colour	Content		
		96	384	768
Reaction Mix	yellow	1 x 1325 µl	4 x 1325 µl	8 x 1325 µl
Enzyme	blue	1 x 19.2 µl	1 x 76.8 µl	2 x 76.8 µl
Positive Control	red	1 x 150 µl	1 x 300 µl	1 x 300 µl
Negative Control	green	1 x 150 µl	1 x 300 µl	1 x 300 µl
Control RNA	colourless	1 x 480 µl	2 x 960 µl	4 x 960 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- RNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023 or KG1024)
- PCR grade water

- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid or optical PCR reaction plate with optical foil
- Optional: Liquid handling system for automation

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -20 °C in the dark immediately after receipt. Up to 20 freeze and thaw cycles are possible. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8 °C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

7 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- The MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR must be performed by qualified personnel only.
- Specimens should always be treated as infectious and/or biohazardous in accordance with safe laboratory procedures.
- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the eluates and the components of the kit.
- Always use DNase/RNase-free disposable pipette tips with aerosol barriers.
- Always wear protective disposable powder-free gloves when handling kit components.
- Use separated and segregated working areas for (1) sample preparation, (2) reaction setup and (3) amplification/detection activities. The workflow in the laboratory should proceed in unidirectional manner. Always wear disposable gloves in each area and change them before entering a different area.

- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- Store positive and/or potentially positive material separated from all other components of the kit.
- Do not open the reaction tubes/plates post amplification, to avoid contamination with amplicons.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accrediting organisations.
- Do not autoclave reaction tubes after the PCR, since this will not degrade the amplified nucleic acid and will bear the risk to contaminate the laboratory area.
- Discard sample and assay waste according to your local safety regulations.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) RT-PCR Kit is RNA isolated from biological specimens (e.g. swabs, sputum).

9 SAMPLE PREPARATION

Commercial kits for RNA isolation such as MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023 or KG1024) are recommended.

Important: In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control RNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the Real-Time-RT-PCR. Furthermore, possible contaminations during nucleic acid extraction will be detectable.

Please note chapter 10 “Control RNA”.

If the Real-Time-RT-PCR is not performed immediately, store extracted nucleic acids according to the instructions given by the extraction kit’s manufacturer.

10 CONTROL RNA

A control RNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the RNA isolation procedure and to check for possible Real-Time-RT-PCR inhibition.

a) Control RNA used as extraction control

MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) control RNA is added to the RNA extraction. Add 5 µl control RNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the RNA isolation according to the manufacturer's instructions. Please follow protocol A.

The control RNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.

b) Control RNA used as internal control of the Real-Time-RT-PCR

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

11 REAL-TIME-RT-PCR

11.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 "Warnings and precautions".
- Before setting up the Real-Time-RT-PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the RT-PCR set up.
- In every RT-PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed and centrifuged very briefly.
- Due to the high viscosity of the enzyme (blue lid), prewarming at room temperature for 15 min is recommended.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

11.2 *Procedure*

If the control RNA is used to control both, the Real-Time-RT-PCR and the RNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control RNA is solely used to detect possible inhibition of the Real-Time-RT-PCR, please follow protocol B.

Protocol A

The control RNA was added during RNA extraction (see chapter 10 "Control RNA"). In this case, prepare the master mix according to table 2.

The master mix contains all of the components needed for RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control RNA was added during RNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
13.8 µl Reaction Mix	13.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)

Protocol B

The control RNA is used for the control of the Real-Time-RT-PCR only (see chapter 10 "Control RNA"). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix (control RNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
13.8 µl Reaction Mix	13.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme	0.2 µl x (N+1)
0.2 µl Control RNA*	0.2 µl x (N+1)*

*The increase in volume caused by adding the control RNA is not taken into account when preparing the PCR assay.

Protocol A and B: Real-Time-RT-PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument / take an optical PCR reaction plate.
- Pipet **14 µl** of master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add **6 µl** of the eluates from the RNA isolation (including the eluate of the water control), the respective positive control, and the negative control the corresponding optical PCR reaction tube / the optical PCR reaction plate (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes / the optical PCR reaction plate immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the Real-Time-RT-PCR

Component	Volume
Master mix	14.0 µl

Component	Volume
Sample	6.0 µl
Total volume	20.0 µl

11.3 Instrument settings

For the Real-Time-RT-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: Real-Time-RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse Transcription	10 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of cDNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and extension	40 s	60 °C	
	Aquisition at the end of this step		

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR.

Real-Time-RT-PCR-instrument	Parameter	Detection channel	Notes															
LightCycler 480II	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	465–510 533–580 533–610 618–660	Colour Compensation Kit CoV-2 (KG19-4 CC CoV-2) required															
			<table border="1"> <thead> <tr> <th>Melt factor</th> <th>Quant factor</th> <th>Max integration time (s)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)	1	10	1	1	10	2	1	10	2	1	10	3
			Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)													
			1	10	1													
			1	10	2													
1	10	2																
1	10	3																
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	FAM HEX ROX Cy5	Gain 8 Gain 1 Gain 1 Gain 4 Reference Dye: None															

Real-Time-RT-PCR-instrument	Parameter	Detection channel	Notes	
ABI 7500	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	FAM JOE ROX Cy5	Option Reference Dye ROX: NO	
AriaMx Bio-Rad CFX96	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	FAM HEX ROX Cy5	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	Green Yellow Orange Red	Gain 5 Gain 5 Gain 5 Gain 5	Outlier removal NTC threshold: 15%
Mic qPCR Cyclcr	RdRP gene / S Gene Control RNA (IPC) ISC E gene	Green Yellow Orange Red	Gain 8 Gain 10 Gain 10 Gain 10	

12 DATA ANALYSIS

The following results can occur (table 7):

Table 7: Interpretation reaction mix

Signal/C _T Values				Interpretation
FAM channel	Cy5 channel	ROX channel	HEX channel	
RdRP gene / S Gene	E gene	ISC	Control RNA (IPC)	
positive	negative	positive or negative	positive or negative**	Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 RNA.
positive	positive	positive or negative	positive or negative**	Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 RNA.
negative	positive	positive or negative	positive or negative**	Positive result, the sample contains SARS-CoV-2 RNA or SARS-CoV-1 RNA*.

Signal/C _T Values				Interpretation
FAM channel	Cy5 channel	ROX channel	HEX channel	
RdRP gene / S Gene	E gene	ISC	Control RNA (IPC)	
negative	negative	positive	≤ 34***	Negative result, the sample contains no SARS-CoV-2 RNA and no SARS-CoV-1 RNA*.
negative	negative	negative	≤ 34***	No diagnostic statement can be made. Amount or quality of sample material not sufficient.
negative	negative	positive	negative or > 34***	Caution! The real time RT-PCR is either inhibited or errors occurred while RNA/DNA extraction.
negative	negative	negative	negative or > 34***	Caution! The real time RT-PCR is either inhibited or errors occurred while RNA/DNA extraction. Amount or quality of sample material not sufficient.

* SARS-CoV-1 infections have not been reported since 2004 [5].

** A strong positive signal in the FAM, Cy5 and/or ROX can inhibit the IC. In such cases the result for the control RNA can be neglected.

*** Depending on the PCR instrument and/or the chosen extraction method, the Ct values might be shifted. The water control can be used as reference. If the HEX Ct value of a sample differs a lot from the water control, partial inhibition has occurred, leading to false negative results in case of weak positive samples.

Figure 1, 2, 3 and 4 show examples for positive and negative real time RT-PCR results.

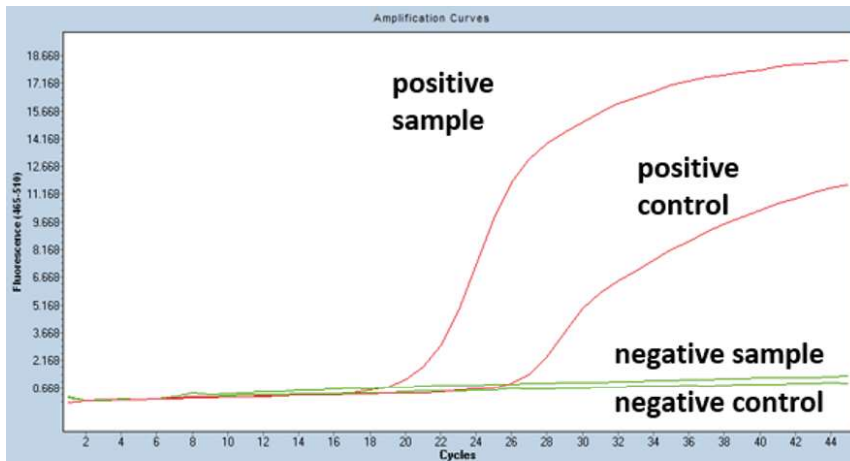


Figure 1: The positive sample shows pathogen specific amplification in the FAM channel (positive sample and positive control), whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample or the negative control (LC480 II real time PCR instrument).

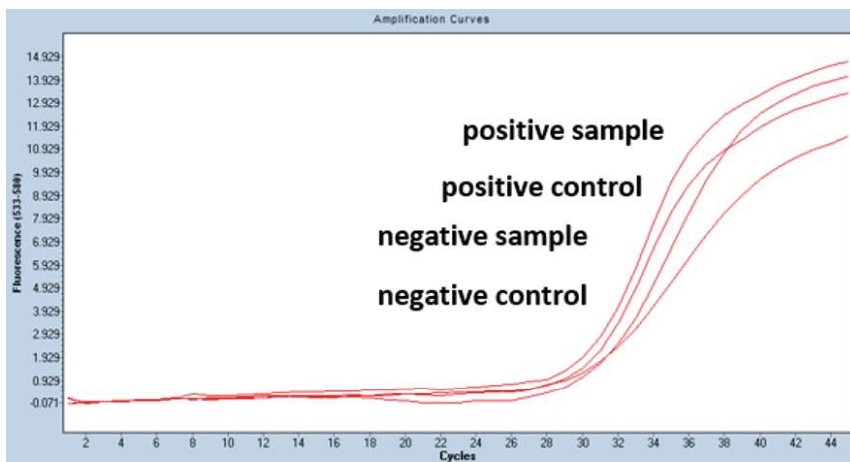


Figure 2: The positive sample, the positive control, the negative control as well as the negative sample show a signal in the control RNA-specific HEX channel (IPC). The amplification signal of the control RNA in the negative sample shows that the missing signals in the pathogen-specific channels FAM and Cy5 are not due to RT-PCR inhibition or failure of RNA isolation, but that the sample is a true negative sample (LC480 II real time PCR instrument).

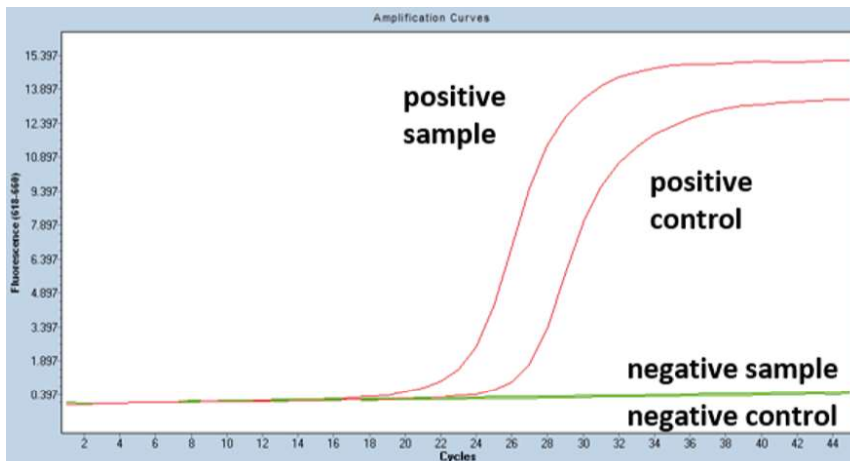


Figure 3: The positive sample shows pathogen-specific amplification in the Cy5 channel (positive sample and positive control), whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample and the negative control (LC480 II real time PCR instrument).

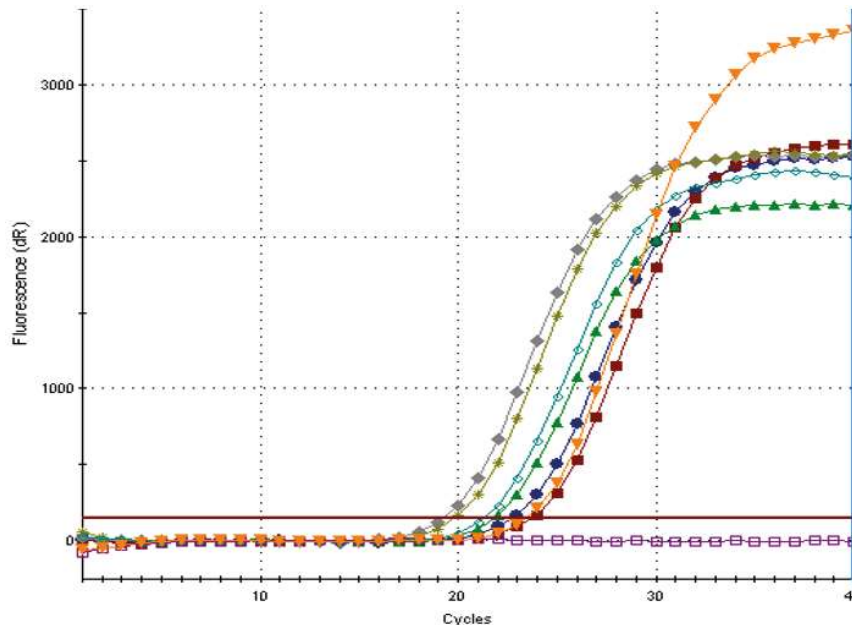


Figure 4: Signals of the amplification of the ISC in the ROX channel. The figure shows the C_T values of eluates from respiratory swabs after nucleic acid extraction using MutaCLEAN® Mag RNA/DNA extraction kit (KG1023); Stratagene Mx3005 P real time PCR instrument.

13 ASSAY VALIDATION

To increase process safety, IPC is included in the negative control and positive control.

Negative controls

The negative control must show no C_T in the FAM and Cy5 channel. The HEX channel (IPC) in the negative control must show a C_T of below 34. Due to the high sensitivity of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) real time RT-PCR, a weak positive result in the ROX channel (ISC) caused by slight contaminations with human DNA during RT-PCR set up cannot completely be ruled out. This does not affect the validity of the respective run (see also internal controls).

Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve in the different channels FAM, Cy5, ROX and HEX. The positive controls must fall below a C_T of 30 except for the HEX channel, which must show a C_T of below 34.

The positive control includes in vitro transcripts and synthetic DNA of approximately 10^4 copies per reaction for RdRP gene, S Gene, E gene and ISC.

Internal controls

All internal controls (ISC and IPC, seqc sample and extraction quality control) must show a positive (i.e. exponential) amplification curve. The control RNA (IPC) must fall below a C_T of 34. If the control RNA is above C_T 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IPC. In the latter case, the assay is valid. It is recommended to perform the extraction of a water control in each run. The IPC in the water control must fall below a C_T of 34. For accurately drawn respiratory swab samples, the ISC shows C_T values from app. 15 to app. 28. A heavily delayed signal of higher than a C_T of 34 indicates a low sample amount. Therefore, false negative results cannot be ruled out. In case of no amplifications neither in the FAM nor in the Cy5 channel, there must be an amplification curve in the ROX channel (ISC) and the HEX (IPC) channel when using eluates of primary samples from multiple species such as mammals and birds.

If other nucleic acid extraction kits are used, the customer must define own cutoffs. In this case the C_T value of the control RNA (IPC) in an eluate from a sample should not be delayed for more than 4 C_T in comparison to an eluate from an extracted water control.

14 LIMITATIONS OF THE METHOD

- Strict compliance with the instructions for use is required for optimal results.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real time PCR and *in vitro* diagnostic procedures.
- Good laboratory practice is essential for proper performance of this assay.
- All reagents should be closely monitored for impurity and contamination. Any suspicious reagents should be discarded.
- This assay must not be used on a biological specimen directly. Appropriate nucleic acid extraction methods have to be conducted prior to using this assay.
- The presence of RT-PCR inhibitors may cause false negative or invalid results.
- Potential mutations within the target regions of the nCoV and Betacoronavirus-Genomes covered by the primers and/or probes used in the kit may result in failure to detect the respective RNA.
- As with any diagnostic test, results of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit need to be interpreted in consideration of all clinical and laboratory findings.

15 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a Real-Time-RT-PCR.

No fluorescence signal in the FAM and Cy5 channel of the positive controls

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the FAM channel for analysis of the nCoV specific amplification, the Cy5 channel for analysis of the betacoronavirus specific amplification, the HEX channel for the amplification of the control RNA and the ROX channel for the amplification of the ISC.

Incorrect preparation of the Master Mix

Make sure the enzyme is added to the master mix (chapter 11).

Incorrect configuration of the Real-Time-RT-PCR

Check your work steps and compare with chapter "Procedure".

The programming of the thermal profile is incorrect

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, storage and stability".

Weak or no signal of the control RNA and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM and/or Cy5 channel

Real-Time-RT-PCR conditions do not comply with the protocol

Check the Real-Time-RT-PCR conditions (chapter 11).

Real-Time-RT-PCR inhibited

Make sure that you use an appropriate isolation method (see "Sample preparation") and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed.

Sample material not sufficient

Make sure enough sample material has been applied to the extraction. Use an appropriate isolation method (see chapter "Sample preparation") and follow the manufacturer's instructions

RNA loss during isolation process

In case the control RNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the RNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, storage and stability".

Detection of a fluorescence signal in the FAM and/or Cy5 channel of the negative control***Contamination during preparation of the RT-PCR***

Repeat the Real-Time-RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the Real-Time-RT-PCR.

Detection of a fluorescence signal in the ROX channel of the negative control***Contamination with human DNA during preparation of the real time RT-PCR***

As long as the ROX channel shows very high C_T values, the contamination is negligible.

If the FAM and Cy5 channel are negative in the negative control, the PCR is still valid for the detection of SARS-CoV-2.

16 KIT PERFORMANCE**16.1 Analytical sensitivity**

The limit of detection (LoD) of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit was determined using serial dilutions of synthetic RNA-fragments containing the nCoV target sequence and the Betacoronavirus target sequence in a Stratagene Mx3005 real time PCR instrument. The LoD of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit is ≤ 10 genome copies per reaction each.

16.2 Analytical specificity

The specificity of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit was evaluated with different other relevant viruses and bacteria found in clinical samples and basing on in silico analyses.

The MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit showed a positive result for the samples containing SARS-CoV-2 and Betacoronavirus RNA sequences, whereas samples containing other pathogens were reliably tested negative. The results are shown in table 8.

Table 8: Eluted DNA and RNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR.

Eluates with known status	Expected result E gene	Expected result RdRP gene / S gene	MutaPLEX® Coronavirus E gene	MutaPLEX® Coronavirus RdRP gene / S gene
	Cy5 channel	FAM channel	Cy5 channel	FAM channel
SARS-CoV-2	<i>positive</i>	<i>positive</i>	<i>positive</i>	<i>positive</i>
SARS-CoV-1	<i>positive</i>	negative	<i>positive</i>	negative
MERS-CoV	negative	negative	negative	negative
HCoV-229E	negative	negative	negative	negative
HCoV-OC43	negative	negative	negative	negative
Influenza A H3N2	negative	negative	negative	negative
Influenza A H5N1	negative	negative	negative	negative
Influenzavirus B	negative	negative	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	negative	negative	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus B	negative	negative	negative	negative
Parainfluenza-virus 1	negative	negative	negative	negative

Eluates with known status	Expected result E gene	Expected result RdRP gene / S gene	MutaPLEX® Coronavirus E gene	MutaPLEX® Coronavirus RdRP gene / S gene
	Cy5 channel	FAM channel	Cy5 channel	FAM channel
Parainfluenza-virus 2	negative	negative	negative	negative
Parainfluenza-virus 3	negative	negative	negative	negative
Parainfluenza-virus 4	negative	negative	negative	negative
Metapneumo-virus	negative	negative	negative	negative
Adenovirus	negative	negative	negative	negative
Rhinoviruses	negative	negative	negative	negative
Enteroviruses	negative	negative	negative	negative
Human Bocavirus	negative	negative	negative	negative
Legionella pneumophila	negative	negative	negative	negative
Mycoplasma pneumophila	negative	negative	negative	negative
Mycobacterium tuberculosis complex	negative	negative	negative	negative
Bordetella pertussis	negative	negative	negative	negative
Bordetella parapertussis	negative	negative	negative	negative
S. aureus	negative	negative	negative	negative
MRSA	negative	negative	negative	negative
MSSA	negative	negative	negative	negative
Streptococcus spp.	negative	negative	negative	negative

16.3 *Clinical samples*

Positive (50) and negative (153) confirmed samples (oral and nasal swabs) from the pandemic outbreak 2020 in Europe were tested.

The RNA was extracted by using the MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023) extraction kit on a KingFisher Prime Duo Instrument.

The PCR experiments were performed on a MX3005p Stratagene Cycler. The retesting of the confirmed samples with MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) showed a sensitivity of 100% and a specificity of 100%. None of the samples were inhibited in the PCR.

	Positive samples	Negative samples
MutaPLEX® Coronavirus positive	50	0
MutaPLEX® Coronavirus negative	0	153
	Sensitivity [%]	Specificity [%]
	100	100

16.4 *Linear range*

The linear range of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit was evaluated by analysing logarithmic dilution series of in vitro transcripts and synthetic DNA fragments.

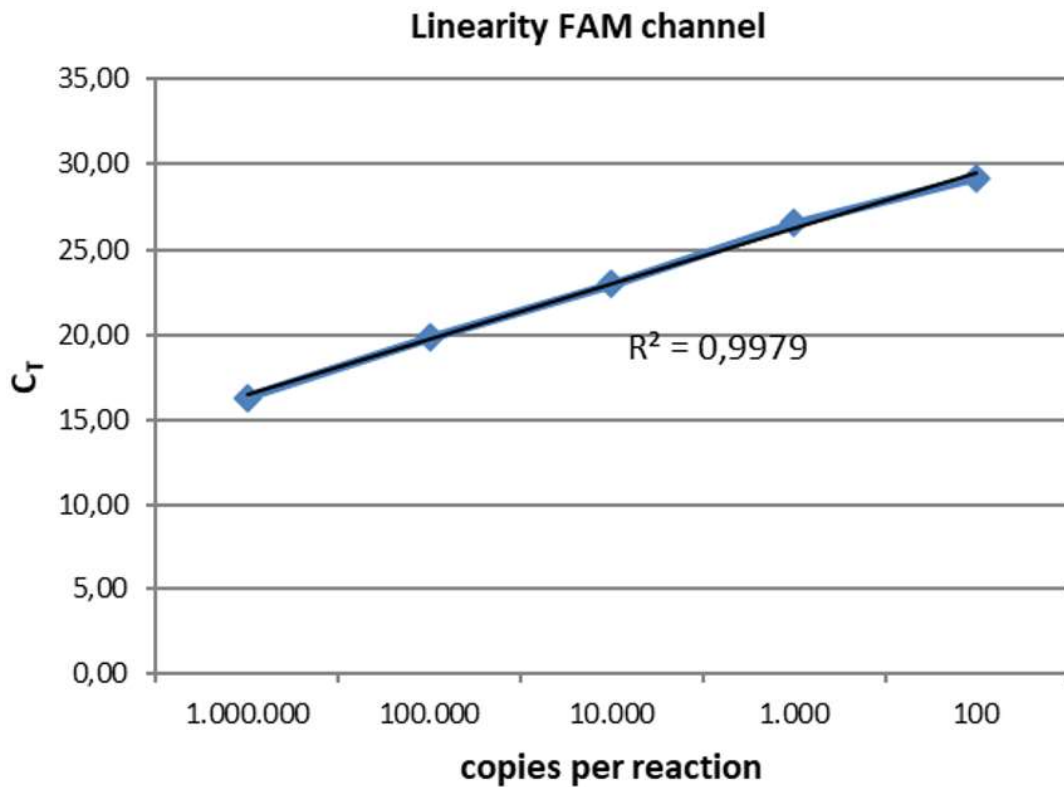


Figure 5: Determination of the linear range of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR in the FAM channel.

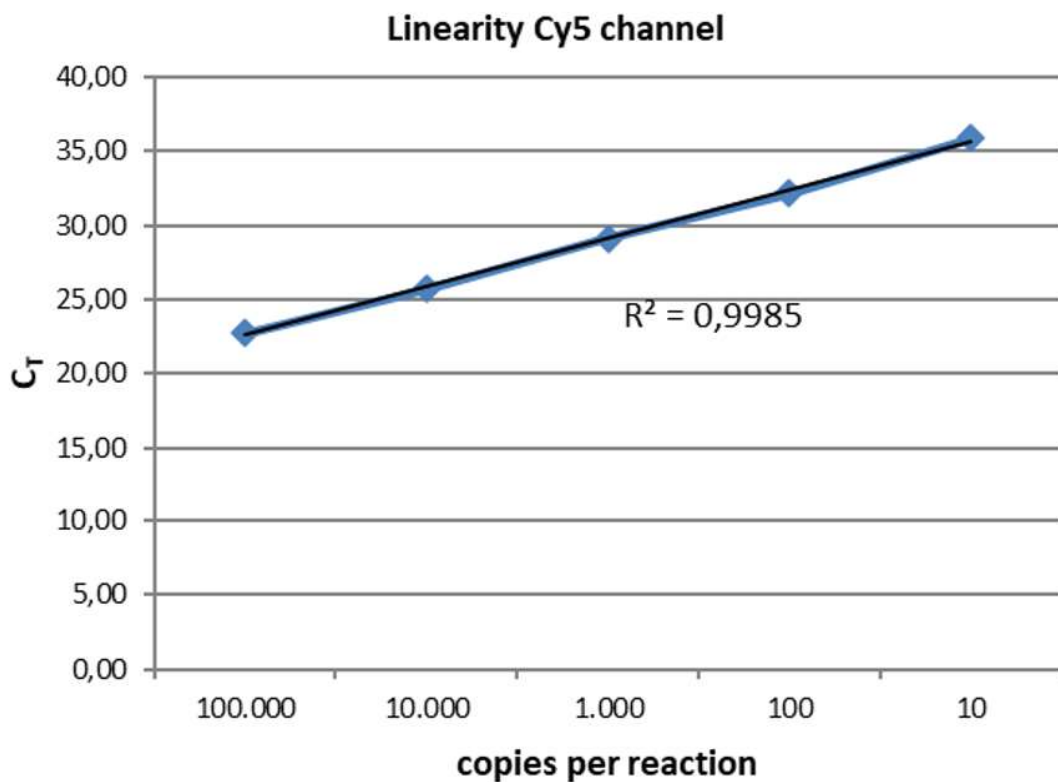


Figure 6: Determination of the linear range of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR in the Cy5 channel.

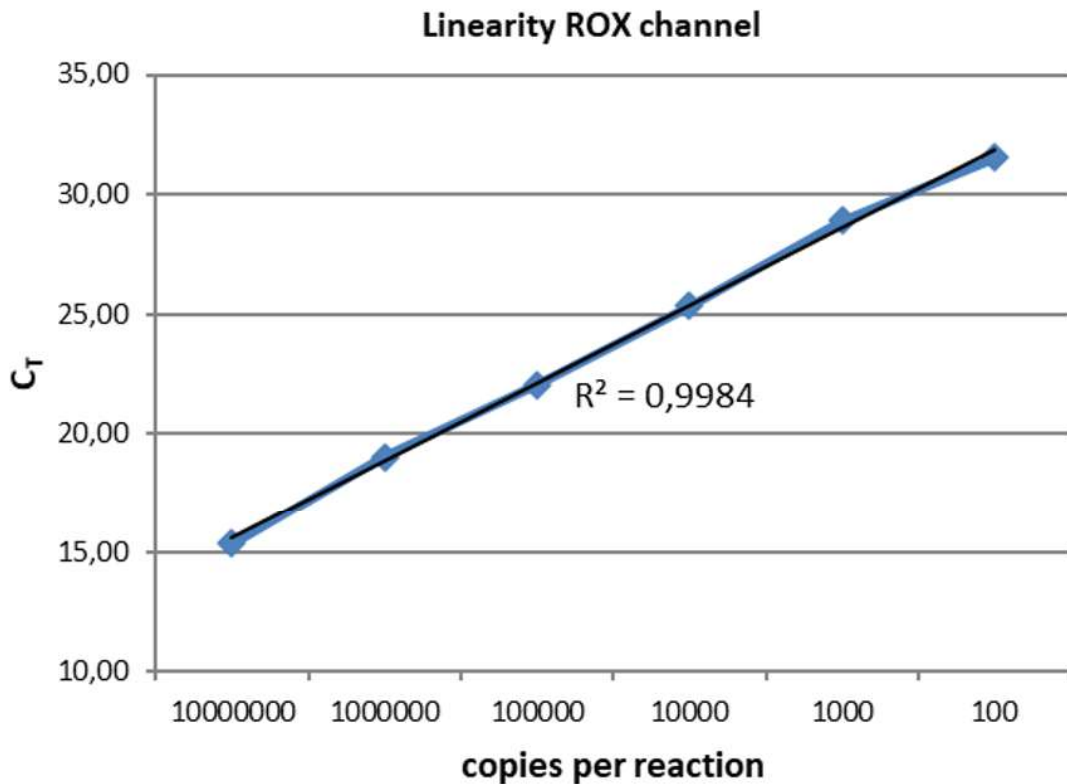


Figure 7: Determination of the linear range of MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR in the ROX channel.

16.5 Precision

The precision of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit was determined as intra-assay variability, inter-assay variability and inter-lot variability. Variability data are expressed by standard deviation and coefficient of variation. The data are based on quantification analyses of defined concentrations of RdRP gene in vitro transcripts and E gene in vitro transcripts, ISC specific DNA and on the threshold cycle of the control RNA (IPC).

Table 8: Precision of the MutaPLEX® Coronavirus (SARS-CoV-2) Real-Time-RT-PCR Kit.

RdRP gene and S Gene (FAM)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	25	0.23	0.77
Inter-Assay Variability	25	0.51	1.71
Inter-Lot Variability	25	0.76	2.56

E gene (Cy5)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	25	0.27	0.84
Inter-Assay Variability	25	0.51	1.50
Inter-Lot Variability	25	0.52	1.61

ISC (ROX)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	25	0.28	0.90
Inter-Assay Variability	25	0.40	1.27
Inter-Lot Variability	25	0.25	0.77

IPC (HEX)	copies/ μl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay Variability	25	0.69	2.31
Inter-Assay-Variability	25	0.58	1.91
Inter-Lot-Variability	25	0.37	1.22
















16.6 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity of Real-Time-RT-PCR assays is mainly dependent on the DNA/RNA extraction method used to isolate DNA and RNA from various biological specimens. DNA/RNA extraction reagents are not part of the Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR kits. Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR kits include an extraction control and guidelines for the validation criteria of the extraction control in each reaction. The extraction control indicates inhibition of the Real-Time-RT-PCR and/or inefficient nucleic acid extraction. It cannot be used as a calibrator.

Therefore, Immundiagnostik AG guarantees the analytical sensitivities and specificities of the real time RT-PCR kits, performed with eluted DNA and RNA from reference materials and ring trial samples and with synthetic nucleic acid fragments. Immundiagnostik AG does not guarantee diagnostic sensitivities. If diagnostic sensitivities are mentioned in manuals of Immundiagnostik AG Real-Time-RT-PCR kits, the data are strictly correlated to a specific nucleic acid extraction method that has been used during the validation of the respective kits and cannot be transferred to other extraction methods.

It is the responsibility of the user to qualify the extraction methods used for DNA/RNA isolation from biological samples.

17 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

(c)DNA	(complementary) Deoxyribonucleid acid		Catalog number
RNA	Ribonucleid acid		To be used with
PCR	Polymerase chain reaction		Contains sufficient for <n> test
RT	Reverse transcrip- tion		Upper limit of temperature
RT-PCR	Reverse transcrip- tion-PCR		Manufacturer
	Reaction mix		Use by
	Enzyme		Lot number
	Positive control		Content
	Negative control		Consult instruc- tions for use
	Control RNA (IPC)		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
nCoV	novel coronavirus	E gene	Envelope gene
RdRP gene	RNA-dependent RNA polymerase gene	S gene	Spike gene

18 LITERATURE

1. www.who.int/health-topics/coronavirus
2. Corman et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time-RT-PCR. *Eurosurveillance*, Volume 25, Issue 3, 23/Jan/2020.
3. www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z, 02/March/2020
4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/coronavirus/>
5. <https://www.nhs.uk/conditions/sars/>

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

