



V Nur für die *in vitro*
Diagnostik.

Kylt[®]

Kylt[®] SARS-CoV-2 Confirmation

Real-Time RT-PCR Detektionskit

www.kylt.eu

Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation

Real-Time RT-PCR Detektionskit

A. Allgemeines

- Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation RTU dient dem spezifischen Nachweis von viraler RNA des novel SARS-CoV-2 in Proben mit positiven Ergebnissen in Kylt® SARS-CoV-2 Screening RTU. Das Kit ist ein in-vitro Diagnostikum für die Untersuchung von humanen Proben, wie z.B. Naso-/Oro-pharyngeal- oder Rektaltupfern bzw. Stuhlproben, bronchoalveoläre Spülflüssigkeit, Sputum sowie Umgebungsproben.
- Der qualitative Nachweis mit Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation RTU Kits basiert auf einer duplex Real-Time RT-PCR: In einem gemeinsamen Reaktionsansatz werden parallel durch spezifische Primerpaare die beiden Zielgene für SARS-CoV-2 (RdRP- und S-Gen) sowie für die Interne Kontrolle (beta-Aktin RNA) zunächst revers transkribiert (Vorgang der Reversen Transkription (RT)) und dann in der Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert. Die amplifizierten Zielgen-Fragmente werden während der laufenden PCR-Reaktion anhand fluoreszierender Sonden in Echtzeit detektiert (Real-Time RT-PCR). Die spezifischen Sonden für die Detektion der amplifizierten Zielgen-Fragmente von SARS-CoV-2 und der Internen Kontrolle sind mit den Fluoreszenz-Farbstoffen FAM und HEX markiert. Die emittierte Fluoreszenz wird separat jeweils optisch durch den Real-Time PCR Thermocycler erfasst. Anhand dieser beiden unabhängigen Analysen im gleichen Reaktionsansatz je Probe sowie anhand der Negativ- und Positivkontrolle je Lauf wird ein valides, qualitatives Ergebnis zum SARS-CoV-2-spezifischen Status der Probe erlangt. Auf diese Art können innerhalb weniger Stunden nach Eingang der Probe Ergebnisse erhalten werden.
- Wir empfehlen Proben vor der Untersuchung mit Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation RTU zuerst mit Kylt® SARS-CoV-2 Screening RTU Kits zu untersuchen.
- Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen. Nur für in vitro-diagnostische Anwendung.
- Das in diesem Kit genutzte Setup entspricht einer publizierten und von der World Health Organization (WHO) gelisteten Real-Time RT-PCR Nachweismethode für SARS-CoV-2.

IVD



AniCon Labor GmbH
Mühlenstr. 13
49685 Höltinghausen
Germany

REF

- 31465 für 100 Reaktionen
- 31466 für 25 Reaktionen

B. Reagenzien und Materialien

- Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation RTU enthält die folgenden Reagenzien:

Reagenz	Deckelfarbe	100 Reaktionen	25 Reaktionen	Lagerung
		Artikelnr. 31465 	Artikelnr. 31466 	
Reaktionsmix	 grün	4 x 450 µl	1 x 450 µl	≤ -18 °C
Positivkontrolle	 rot	4 x 50 µl	2 x 50 µl	≤ -18 °C
Negativkontrolle	 blau	1 x 1 ml	1 x 1 ml	≤ -18 °C

- Umgehend nach Erhalt sind das Kit und seine Komponenten bei ≤ -18 °C zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Kits oder der Komponenten ist zu vermeiden. Reagenzien sollten so kurz wie möglich im aufgetauten Zustand verbleiben. Bei regelmäßiger Untersuchung nur weniger Proben sollten vor der Lagerung bei ≤ -18 °C entsprechende Aliquots der Reagenzien vorbereitet werden. Die Aliquots des Reaktionsmixes sollten so dosiert werden, dass sie nicht mehr als dreimal eingefroren und aufgetaut werden. Die Negativkontrolle kann alternativ bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden.
- Das Kit und seine Bestandteile sind bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zu dem angegebenen Ablaufdatum verwendbar (siehe Etikett des Umkartons). Die Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht miteinander vermischen.
- Der Reaktionsmix muss dunkel gelagert werden und sollte nicht direktem (Sonnen-)Licht ausgesetzt werden.

C. Nicht enthaltene Ausstattung und Reagenzien

- Diese Detektionsmethode kann auf allen handelsüblichen Real-Time PCR Thermocyclern eingesetzt werden, die die emittierte Fluoreszenz der Farbstoffe FAM und HEX (Emission von 520 und 550 nm) erfassen. Bitte beachten: die standardmäßige Normalisierung gegen ROX (z.B. bei ABI Cyclern) muss deaktiviert werden.
- Neben dem Verbrauchsmaterial wird folgende Ausstattung benötigt, die nicht in Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation RTU Kits enthalten ist:
 - RNA-Extraktionskit / -protokoll (z.B. Kylt® RNA / DNA Purification)
 - Tischzentrifuge
 - Vortexer
 - Mikropipetten, geeignet für Volumina von 1 µl bis 1000 µl
 - Zentrifuge für PCR-Reaktionsgefäße und -platten
- Ergänzende Kylt® Produkte: Kapitel H "Ähnliche und Ergänzende Produkte".
- Wir empfehlen den ausschließlichen Gebrauch von zertifiziert Nuklease-freien Verbrauchsmaterialien sowie von puderfreien Schutzhandschuhen. Handschuhe sind während des gesamten Arbeitsprozesses zu tragen. Die Handschuhe sind möglichst häufig zu wechseln, insbesondere nach Verschütten oder bei Verdacht auf anderweitige Kontaminationen.

D. Kontrollreaktionen

- Die Positivkontrolle ermöglicht es, die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und des PCR-Laufes selbst sowie die einwandfreie Funktion der Real-Time RT-PCR und des Real-Time PCR Thermocyclers zu kontrollieren.
- Die Negativkontrolle ermöglicht es, den Eintrag von Kontaminationen auszuschließen. Nur wenn sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle in jedem PCR-Lauf angewendet und als valide verifiziert werden, kann der gesamte Lauf in der abschließenden Auswertung als valide bewertet werden.
- Die Interne Kontrolle basiert auf der Detektion von beta-Aktin RNA, welche ubiquitär in den Wirtszellen vorkommt aus denen die Probe stammt. Die beta-Aktin RNA wird in jeder einzelnen Reaktion revers transkribiert und coamplifiziert (Kanal HEX) und erlaubt die Evaluation der Probenahme, Probenlagerung und -transport, Probenvorbereitung und der Real-Time RT-PCR selbst.
- Es wird empfohlen eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC) je RNA-Präparationsvorgang, abhängig von der Gesamtanzahl an Proben eines Durchganges, zu verwenden. Die RIC sollte nur aus dem sterilen Puffer bestehen, der auch zur Probenvorbereitung verwendet wird. Die RIC wird wahllos zwischen die Proben eingereiht, wie eine normale Probe behandelt und ermöglicht eine Detektion potentieller Kontaminationen der verwendeten Reagenzien (zusätzlich zur Negativkontrolle) ebenso wie eine Detektion möglicher Kreuzkontaminationen / Verschleppung zwischen individuellen Proben während der RNA-Präparation.

E. Protokoll *(siehe auch Kurzanleitung am Ende dieser Gebrauchsinformation)*

- Die Gesamtmethode des Nachweises umfasst folgende Schritte:
 1. Probenvorbereitung
 2. RNA Aufbereitung
 3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (Real-Time RT-PCR)
 4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis
- Es wird empfohlen, das Protokoll ohne Unterbrechung zu befolgen, um eine potentielle Degradierung der vorbereiteten Proben und Reagenzien zu vermeiden. Wenn erforderlich, können fertige RNA Präparationen bei $\leq -18\text{ °C}$ oder $\leq -70\text{ °C}$ gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der RNA Präparationen sollte vermieden werden.

1. Probenvorbereitung

- Tupferproben werden in ausreichendem Volumen steriler Pufferlösung (z. B. physiologische Kochsalzlösung oder 0,1 x TE) inkubiert. Anschließend werden die Proben durch ausgiebiges Puls-Vortexen ausgewaschen.
- Der ausgewaschene Überstand wird für die RNA-Präparation verwendet.
- Einzelne, kleine Tupfer können direkt in Lysispuffer gegeben werden.

2. RNA Präparation

a) Kylt® RNA Präparation (mit Hilfe der Kylt® RNA / DNA Purification Produkte)

- Alle Probenmatrices inkl. Tupferproben können mit Kylt® RNA/DNA Purification Produkten aufgereinigt werden (vgl. Kapitel H "Ähnliche und Ergänzende Produkte").
- Detaillierte Informationen sind den Gebrauchsanweisungen für die Kylt® RNA / DNA Purification Produkte zu entnehmen, siehe auch Kapitel H "Ähnliche und Ergänzende Produkte".

b) RNA Präparation mit anderen Methoden

- Alle Probenmatrices inkl. Tupferproben können mit geeigneten Kits oder Hausmethoden aufgereinigt werden, wenn diese entsprechend verifiziert wurden.
- Andere Kits oder Hausmethoden können zur RNA Präparation verwendet werden, solange die Qualität eine ausreichende Amplifikation und Detektion der Internen Kontroll-RNA ermöglicht.

3. Reaktions-Setup, Reverse Transkription und Amplifikation (Real-Time RT-PCR)

- Aufgetauter Reaktionsmix und Negativkontrolle werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Zu Beginn wird die Zahl benötigter PCR-Reaktionen bestimmt: Zu der Anzahl der zu untersuchenden Proben werden zwei weitere Reaktionen für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle addiert.
- Der Reaktionsmix wird durch Vortexen gemischt, zentrifugiert und 16 µl zu jedem PCR-Reaktionsgefäß oder in jede PCR-Plattenvertiefung ("Kavität") gegeben.
- Der Reaktionsmix sollte (Sonnen-)Licht möglichst nur kurz ausgesetzt werden und sofort wieder bei der richtigen Temperatur gelagert werden. Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren von Mix, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- 4 µl der Negativkontrolle werden in die entsprechende Kavität gegeben und nach Möglichkeit einzeln verschlossen.
- 4 µl Proben-RNA (finale RNA-Präparationen – inklusive RIC(s), wenn durchgeführt), werden zur entsprechenden Kavität gegeben und diese, wenn möglich, einzeln verschlossen.
- Zur Risikominimierung potentieller Kreuzkontaminationen werden 4 µl der Positivkontrolle erst nach Zugabe aller Proben und Kontrollen in die entsprechende Kavität gegeben. Vor jedem Gebrauch die aufgetaute Positivkontrolle kurz vortexen und abzentrifugieren (siehe auch Kapitel B „Reagenzien und Materialien“).
- Wenn nicht bereits vorher geschehen, werden zum Schluss alle Kavitäten verschlossen. In jedem Fall wird empfohlen, die Kavitäten vor dem Start des Real-Time RT-PCR-Laufes zu zentrifugieren.
- Die Platte wird in den Real-Time PCR Thermocycler gestellt und die Amplifikation mit dem Kylt® Profil I wie unten angegeben gestartet.

Kylt® Profil I				
Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer	
1	Reverse Transkription	50 °C	10 min	
2	Aktivierung Polymerase	95 °C	1 min	
3	Denaturierung	95 °C	10 sek	} 42 Zyklen
4	Annealing & Extension	60 °C	1 min	
5	Fluoreszenzmessung	Kanäle FAM und HEX		

- Kylt® Profil I ermöglicht die Kombination von Läufen dieser und den meisten anderen Kylt® RT-qPCR Detektionsmethoden sowie qPCR Detektionsprodukten.
- Bei einem kombinierten Real-Time (RT-)PCR Lauf muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle benötigten Kanäle detektiert werden.
- Bitte beachten Sie die Geräte-spezifischen Angaben des Herstellers zu Ihrem Real-Time PCR Thermocycler.

4. Auswertung – Validität und Qualitatives Ergebnis

Allgemeines

- Die Daten der Amplifikationsreaktionen können automatisch mit der spezifischen Software des Real-Time PCR Thermocyclers verarbeitet werden. Alternativ kann auch manuell ein Threshold gesetzt werden, dabei ist folgendes zu beachten: Der Threshold sollte die FAM-Kurve und die HEX-Kurve im Bereich des linearen Anstiegs schneiden (logarithmische Skalierung der y-Achse). Durch das Setzen der Thresholds ergeben dessen Schnittpunkte mit der HEX- und der FAM-Kurve die entsprechenden sogenannten "Cycle Thresholds" (Ct), die negativ mit der anfänglichen Konzentration der Zielgen-Kopien in der Real-Time PCR-Reaktion korrelieren.
- Nur Kurvenverläufe mit einer typischen exponentiellen Amplifikation, d.h. die Kurve der Rohdaten zeigt zu Beginn eine flache Basislinie, gefolgt von einem deutlichen (exponentiellen) Anstieg der Fluoreszenz und gegebenenfalls dem Erreichen einer Plateau-Phase (bei logarithmischer Skalierung der y-Achse), sind als positiv zu bewerten.
- Für die Testauswertung wird zunächst die Validität des Laufes bestimmt. Danach wird die Validität der einzelnen Proben mit Hilfe der Internen Amplifikations-Kontrolle anhand des zugehörigen Kanals (HEX) bestimmt. Schlussendlich wird der SARS-CoV-2-spezifische Status jeder Probe analysiert (FAM).

Testauswertung

- Der **Real-Time RT-PCR Test** ist nur **valide**, wenn die FAM- und HEX-Kurve der Negativkontrolle negativ ($Ct > 35$) und die FAM- und HEX-Kurve der Positivkontrolle positiv sind. Für einen validen Test sollte der FAM-Ct-Wert der Positivkontrolle > 15 und ≤ 35 sein.
- Falls eine oder mehrere RNA-Isolationskontrollen (RIC(s)) mitgeführt wurden, sollten die entsprechenden FAM- und HEX-Kurven keinen Ct-Wert ergeben ($Ct > 35$ für HEX-Kurven).

Ziel	Kanal	Signal		
Interne Kontrolle	HEX	positiv	positiv / negativ	negativ
SARS-CoV-2	FAM	negativ	positiv	negativ
Die Probe ist SARS-CoV-2		negativ	positiv	gehemmt

- Eine **Probe ist negativ für SARS-CoV-2**, wenn ihre HEX-Kurve positiv ($Ct \leq 35$), aber ihre FAM-Kurve negativ ist.
- Eine **Probe ist positiv für SARS-CoV-2**, wenn ihre FAM-Kurve positiv ist ($Ct \leq 42$), unabhängig von der HEX-Kurve.
- Eine **Probe ist gehemmt**, wenn weder ihre FAM-Kurve noch ihre HEX-Kurve positiv ist.
- **Empfehlung:** Im Fall eines invaliden Testergebnisses kann der Test mit z. B. einer 1:4-Verdünnung der entsprechenden RNA wiederholt werden. Die Negativkontrolle dient hierbei als Verdünnungsmedium. Vorzugsweise wird die gesamte RNA-Präparation mit einer neuen Probe wiederholt.
- Einfache und zuverlässige Dateneingabe zu den Proben, Start des Real-Time RT-PCR-Laufes sowie anschließende qualitative Proben-Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse kann mittels der Kyt® Software vorgenommen werden.

5. Produkteinschränkungen

- Nutzer müssen im Umgang mit diesem Produkt und den Prozessabläufen der Methode vor der Nutzung geübt und vertraut sein.
- Mit diesem Produkt gewonnene Ergebnisse müssen im Kontext mit klinischen und ggf. weiteren Laborbefunden beurteilt werden. Es liegt in der Verantwortung des Nutzers ggf. notwendige, über die in den in Kapitel F angegebenen Leistungsdaten hinausgehenden Validierungen oder Verifizierungen für die jeweiligen Laborprozesse durchzuführen.
- Ein negatives Ergebnis bestätigt nicht einen "nicht-infiziert"-Status, da alle Ergebnisse von der korrekten Probenahme, einer ausreichenden Viruslast in der Probe, die über dem LOD liegt, sowie von der Abwesenheit von PCR-Inhibitoren abhängt, die zu ungültigen Ergebnissen führen können. Die Interne Kontrolle in diesem Produkt ermöglicht die Überprüfung der Anwesenheit von Inhibitoren und minimiert dadurch das Risiko falsch-negativer Ergebnisse.

F. Leistungsdaten

1. Analytische Sensitivität

- Die Nachweisgrenze liegt bei < 10 Kopien pro µl RNA-Eluat unter Verwendung einer in-vitro transkribierten RNA spezifisch für das Zielgen von SARS-CoV-2.

2. Analytische Spezifität

2.1 Inklusivität

- Die Bestimmung der epidemiologischen Sensitivität basiert auf der theoretischen Prüfung unter Verwendung der Nukleotidsequenz-Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information). Die Oligonukleotid-Sequenzen (Primer und Sonde) der Methode wurden im Hinblick auf eine Kreuzreaktion oder unspezifische Hybridisierung *in silico* getestet. Dazu wurden die Oligonukleotid-Sequenzen mit der nicht redundanten Datenbank für DNA und RNA ("GenBank", NCBI) mittels Primer-BLAST und NBLAST abgeglichen.
- Dieses Produkt detektiert alle 92 verfügbaren vollständigen Genomsequenzen von SARS-CoV-2.

2.2 Exklusivität

- Um die Exklusivität der RdRP-Gen-Detektionsmethode zu prüfen, wurden 21 Stämme, die beim Menschen gefunden wurden, aber nicht zur Gattung Betacoronavirus der Linie B Sarbecovirus gehören, mit der Methode analysiert. Keiner der Stämme wurde mit der RdRP-Gen-Detektionsmethode nachgewiesen#.

Stamm	Ergebnis
HCoV-HKU1	Nicht nachweisbar
HCoV-OC43	Nicht nachweisbar
HCoV-NL63	Nicht nachweisbar
HCoV-229E	Nicht nachweisbar
MERS-CoV	Nicht nachweisbar
Influenza A H1N1	Nicht nachweisbar
Influenza A H3N2	Nicht nachweisbar
Influenza A H5N1	Nicht nachweisbar
Influenza A H7N9	Nicht nachweisbar
Influenza B	Nicht nachweisbar
Rhinovirus / Enterovirus	Nicht nachweisbar
Respiratorisches Syncytial Virus	Nicht nachweisbar
Parainfluenza Virus 1	Nicht nachweisbar
Parainfluenza Virus 2	Nicht nachweisbar
Parainfluenza Virus 3	Nicht nachweisbar
Parainfluenza Virus 4	Nicht nachweisbar
Humanes Metapneumovirus	Nicht nachweisbar
Adenovirus	Nicht nachweisbar
Humanes Bocavirus	Nicht nachweisbar
Legionella spp.	Nicht nachweisbar
Mycoplasma spp.	Nicht nachweisbar

- Darüber hinaus wurde für beide im Kylt® SARS-CoV-2 Confirmation Kit enthaltenen spezifischen Assays die Kreuzreaktion mit anderen Viren in silico mit Hilfe der Nukleotidsequenz-Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology) analysiert. Dazu wurden die Oligonukleotidsequenzen theoretisch hinsichtlich Kreuzreaktion und unspezifischer Hybridisierung getestet.
- Die Methode zeigt keine Kreuzreaktion mit anderen Viren, insbesondere nicht mit anderen Sarbecoviren wie Sars-CoV oder sonstigen Coronaviridae bzw. Spezies der Gattungen Alpha-, Beta-, Delta- oder Gammacoronavirus.

[3. Reproduzierbarkeit](#)

- Um die Intraassay-Varianz zu testen, wurden Proben mit definierten CT-Werten in Wiederholungen desselben PCR-Laufs analysiert. Die Standardabweichung der Replikate beträgt < 0,5 CT-Werte, der Korrelationskoeffizient ist < 5 %.




[4. Robustheit](#)

- Um die Interassay-Varianz zu testen, wurden Proben mit definierten CT-Werten auf verschiedenen Geräten durch verschiedene Anwender analysiert. Die Standardabweichung der Proben beträgt < 0,5 CT-Werte, der Korrelationskoeffizient ist < 5 %.

[5. Referenzen](#)

- # V. Corman et al., "Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR," 2020.

G. Genutzte Symbole

-  Medizinisches Produkt für die In Vitro Diagnostik
-  Artikelnummer
-  Hersteller

H. Ähnliche und Ergänzende Produkte

Produkt	Artikelnr.	Reaktionen	Beschreibung
Kylt® SARS-CoV-2 Screening	31466 / 31464	100 / 25	Untersuchung von Proben auf Sarbecoviren inkl. novel SARS-CoV-2
Kylt® RNA / DNA Purification	31314 / 31315	250 / 50	Kombinierte RNA und DNA Aufreinigung aus allen geeigneten Probenmatrices
Kylt® RNA / DNA Purification HTP	31826	4x96	Kombinierte, Magnetpartikel-basierte Aufreinigung von RNA und DNA aus allen geeigneten Probenmatrices, konzipiert für automatisierte Hochdurchsatz-Verfahren
Kylt® Purifier	31436	--	Aufreinigungssystem für Magnetpartikel-basierte Verfahren. Bis zu 96 Proben in unter 45 Minuten.

I. Bestellinformationen

Für schnellen und effizienten Service senden Sie Ihre Bestellung bitte an order to orders@kylt.eu und senden Sie folgende Informationen:

- Lieferadresse
- Rechnungsadresse
- Telefonkontakt des Bestellers
- Name und Telefonnummer des Endnutzers (wenn abweichend)
- Bestellnummer
- Produktbeschreibung und Artikelnummer
- Menge und Größe der Produkte



Produktion:

AniCon Labor GmbH | Mühlenstr. 13 | D-49685 Höltinghausen | Germany | www.kylt.eu | info@kylt.eu

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von Kylt® *In-Vitro* Diagnostika ist ISO 9001:2015 zertifiziert.

Kylt® ist ein eingetragenes Warenzeichen.

Nur für *in vitro*-Gebrauch. Die regulatorischen Anforderungen können je nach Land variieren, dadurch sind ggf. nicht alle beschriebenen Produkte in Ihrer Region erhältlich.

© 2020 AniCon Labor GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der AniCon Labor GmbH bzw. der entsprechenden Markeninhaber.

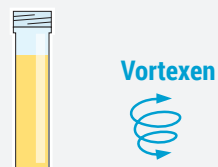


KURZANLEITUNG

Real-Time RT-PCR Setup

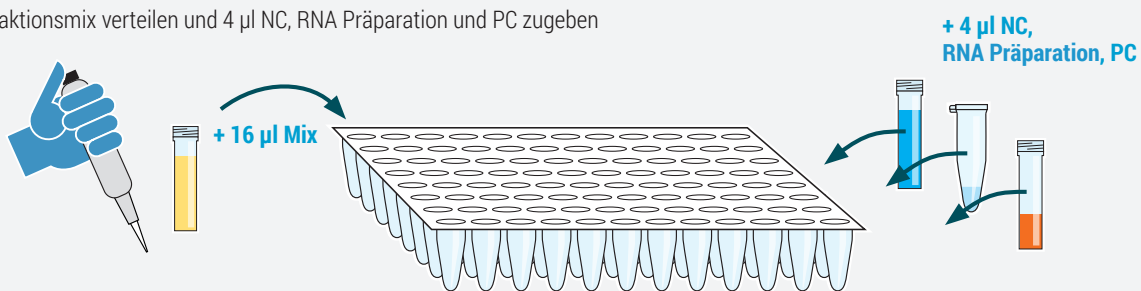
1

Pulsvortexen und zentrifugieren



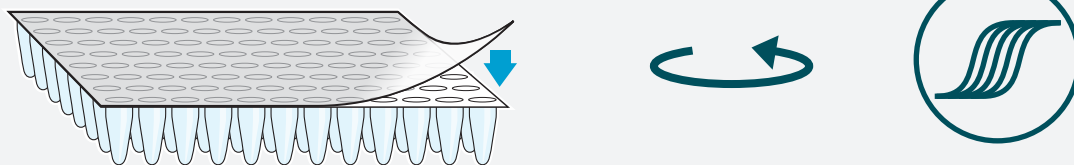
2

Reaktionsmix verteilen und 4 µl NC, RNA Präparation und PC zugeben



3

Kavitäten verschließen, zentrifugieren (empfohlen) und Thermocycler starten



4

Analyse

