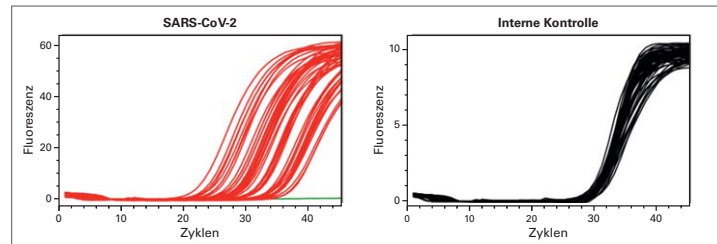




EURORealTime SARS-CoV-2



- PCR-Test zur spezifischen Detektion von SARS-CoV-2 (CE-gekennzeichnet und zugelassen durch die FDA im Rahmen der Emergency Use Authorization (EUA))
- Schneller und einfacher Erregernachweis mittels reverser Transkription und Real-Time-PCR in einem Schritt
- Hohe Sensitivität durch gleichzeitigen Nachweis von zwei SARS-CoV-2-Zielsequenzen
- Nur ein Reaktionsansatz pro Probe

Technische Daten

Testprinzip	Reverse Transkription des SARS-CoV-2-Genoms mit nachfolgender PCR-Amplifizierung und Real-Time-Detektion mithilfe spezifischer Primer und Sonden
Testablauf	Reverse Transkription und Real-Time-PCR in einem Ansatz (ca. 90 min)
Reagenzien	Gebrauchsfertig
Kontrollen	Interne Inhibitions- und Extraktionskontrolle (RNA), SARS-CoV-2-Positivkontrolle (RNA), Negativkontrolle
CE-IVD-Zertifikat	Komplettes System validiert für folgende Real-Time-PCR-Cycler: LightCycler® 480 (Roche), 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), CFX 96 Touch (Bio-Rad). Andere Geräte sind vom Anwender selbst zu validieren.
Packungsformat	25, 50, 100 oder 200 Reaktionen
Bestell-Nr.	MP 2606-0125, -0225, -0425, -0100, -0200

Klinische Bedeutung

Das *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2* (SARS-CoV-2, vormals 2019-nCoV) gehört zur Familie der Coronaviren und wird wie SARS-CoV in die Gattung *Betacoronavirus* eingeordnet. Das neuartige Coronavirus hat seinen Ursprung in China, in der Stadt Wuhan, Provinz Hubei. Es löste eine Infektionswelle aus, die sich im Land und weltweit rasch ausbreitete. Wenige Tage nach der ersten Meldung über Patienten mit Pneumonie unklarer Ursache wurde SARS-CoV-2 als ursächlicher Erreger identifiziert.

SARS-CoV-2 wird hauptsächlich durch Tröpfcheninfektion beim Husten oder Niesen und bei engem Kontakt mit Infizierten übertragen. Gesundheitspersonal und Familienangehörige gehören zu den Hochrisikopopulationen. Ein zoonotisches Reservoir des Virus scheinen Fledermäuse zu sein. Die Inkubationszeit des SARS-CoV-2 beträgt 3 bis 7, maximal 14 Tage. Die Symptome einer SARS-CoV-2-Pneumonie sind Fieber, Husten, Atembeschwerden und Erschöpfung. Bei den meisten Patienten äußert sich die Infektion durch Symptome einer leichten fieberhaften Erkrankung mit unregelmäßigen Lungeninfiltraten, ein Teil der Patienten, vor allem alte und chronisch kranke Menschen, entwickelt ein schweres akutes Atemnotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) mit tödlichem Ausgang in etwa 3% der Fälle. Die Erkrankung, die durch SARS-CoV-2 hervorgerufen wird, wurde im Februar 2020 von der WHO „COVID-19“ genannt.

Zur Diagnose einer SARS-CoV-2-Infektion sind der Direktnachweis des Virus mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) in erster Linie aus Probenmaterialien der oberen Atemwege (nasopharyngeale und oropharyngeale Abstriche) und der unteren Atemwege (bronchoalveoläre Lavage, Trachealsekret, Sputum u. a.) sowie der Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 im Blut geeignete Verfahren. Die Bestimmung von Antikörpern ermöglicht die Bestätigung von SARS-CoV-2-Infektionen bei Patienten mit typischen Symptomen und bei Verdachtsfällen ohne Symptomatik und trägt zu Monitoring und Ausbruchskontrolle bei. Für aussagekräftige serologische Ergebnisse sollten 2 Patientenproben untersucht werden, eine aus der akuten (Woche 1 der Erkrankung) und eine aus der Rekonvaleszenzphase (3 bis 4 Wochen später).

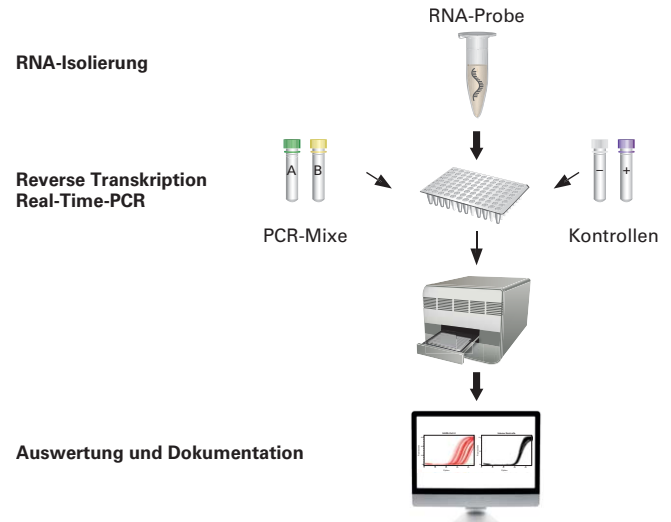
Kreuzreaktionen von Antikörpern innerhalb der Gattung *Betacoronavirus* sind bekannt. Derzeit gibt es keine Medikamente und Impfstoffe zur Bekämpfung dieses neuen Virus.

Zum Nachweis akuter SARS-CoV-2-Infektionen ist der direkte Erregernachweis mittels Nukleinsäureamplifikation die Methode der Wahl. Dieser ermöglicht selbst bei subklinischen oder asymptomatischen Verläufen einen Erregernachweis wenige Tage nach dem Viruskontakt bis zu ca. 14 Tagen nach dem Einsetzen der Symptome (Liu et al., 2020). Mit dem Einsetzen der Immunreaktion und der damit einhergehenden Reduktion der Viruslast sinkt jedoch die Sensitivität von Direktnachweisen. Der Erreger ist dann nicht mehr in jedem Patienten nachweisbar.



Testprinzip

Das Testsystem beruht auf einer One-Tube-Reaktion, basierend auf reverser Transkription (RT) zur Konvertierung viraler RNA in komplementäre DNA (*cDNA, complementary DNA*), gefolgt von PCR-Amplifizierung und fluoreszenzbasiertem Real-Time-Nachweis zweier definierter Abschnitte innerhalb des ORF1ab- und des N-Gens des SARS-CoV-2-Genoms. Reverse Transkription, Amplifizierung und Detektion der SARS-CoV-2-cDNA werden mithilfe spezifischer Primer und Sonden durchgeführt. Der Test beinhaltet eine interne Amplifikationskontrolle, die als Inhibitionskontrolle dient und zusätzlich als Extraktionskontrolle eingesetzt werden kann. Eine im Testset enthaltene SARS-CoV-2-Positivkontrolle wird als externe Kontrolle in jedem Testlauf mitgeführt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgt mit der Auswertesoftware des jeweiligen Real-Time-PCR-Cyclers.



Analytische Sensitivität

Die im EUROrealTime SARS-CoV-2 verwendeten Primer und Sonden wurden auf Basis der folgenden Sequenz für SARS-CoV-2 entwickelt: NC_045512.2 (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*). Die untere Nachweisgrenze (*Limit of Detection, LoD*) wurde mit quantifizierter SARS-CoV-2-spezifischer RNA (In-vitro-Transkripte (IVT)) bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde in drei unabhängigen Untersuchungen mit drei unabhängigen Chargen mit jeweils 21 Replikaten in Anwesenheit von 200 ng humaner Nukleinsäure in $\geq 95\%$ der Ansätze bestätigt. Die untere Nachweisgrenze versteht sich als Mindestnachweisgrenze und liegt bei 1 cp/ μ l Nukleinsäureeluat. In der Regel werden mit dem Testsystem tatsächlich auch weniger Kopien (cp) der RNA nachgewiesen.

Analytische Spezifität

Die Spezifität des Testsystems wird durch das Primer- und Sonden-design sowie die in der Testanleitung angegebenen PCR-Bedingungen gewährleistet. Alle verwendeten Primer und Sonden wurden anhand von Sequenzvergleichsanalysen auf mögliche Homologien zu allen in der „nr“-Datenbank des NCBI verfügbaren Sequenzen (Stand: 13. Februar 2020) überprüft, um mögliche Kreuzreaktivitäten auszuschließen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Zusätzlich wurde Nukleinsäure von Erregern, die im Respirationstrakt vorkommen können oder eng mit SARS-CoV-2 verwandt sind, mit dem EUROrealTime SARS-CoV-2 untersucht. In keinem Fall wurde eine Kreuzreaktion (KR) detektiert (s. Tabelle). Um Kreuzreaktionen mit humaner genomischer DNA oder RNA auszuschließen, wurden jeweils 100 ng/Reaktion eingesetzt. In keinem Fall wurde eine Kreuzreaktion detektiert.

Erreger-Nukleinsäure (1 ng Nukleinsäure/Reaktion)	KR	Parainfluenza-Virus 1–3	0%
<i>Bordetella pertussis</i>	0%	Respiratorisches Syncytial-Virus A	0%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	0%	Rhinovirus	0%
Coronavirus HKU1	0%	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0%
Coronavirus MERS	0%	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0%
Coronavirus NL63	0%		
Coronavirus OC43	0%		
Coronavirus SARS HKU39849	0%		
Coronavirus 229E	0%		
<i>Haemophilus influenzae</i>	0%		
Influenza-Virus A	0%		
<i>Legionella pneumophila</i>	0%		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0%		
Parainfluenza-Virus 1–3	0%		

Erreger-Nukleinsäure (<1 ng Nukleinsäure/Reaktion)	KR
Adenovirus 5	0%
Enterovirus 71	0%
Influenza-Virus B	0%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0%
Parainfluenza-Virus 4	0%
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	0%
Respiratorisches Syncytial-Virus B	0%

Evaluierung

In einer Evaluierungsstudie wurden die diagnostische Sensitivität und Spezifität des EUROrealTime-SARS-CoV-2-Tests im Vergleich mit einem SARS-CoV-2-Real-Time-PCR-Referenztest analysiert. Die Untersuchung von 164 Rachenabstrichen ergab eine Übereinstimmung der mit beiden Testsystemen erzielten positiven und negativen Ergebnisse von 98,2% bzw. 100%.

164 Proben (Rachenabstriche)		Externe Vorcharakterisierung mit SARS-CoV-2-Real-Time-PCR-Referenztest*	
		positiv	negativ
EUROIMMUN-EUROrealTime-SARS-CoV-2	positiv	107	0
	negativ	2	55

* Testkit von TIB MOLBIOL