

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2

REF

67COV2-2

100 Tests

**Gebrauchsanweisung /
Instructions for Use**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only**



Deutsch

Seiten

02–07



English

Pages

08–13

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Verwendungszweck

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 ist ein *in-vitro*-Diagnostik-Kit zum qualitativen Nachweis des neuartigen SARS-CoV-2 Coronavirus in humanem, respiratorischen Probenmaterial.

Das Kit soll zur frühzeitigen Diagnostik von SARS-CoV-2-Infektionen symptomatischer Patienten oder bei Personen mit Verdacht auf COVID-19 dienen.

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 ist nur von geschultem Fachpersonal in entsprechend ausgestatteten Laboren und unter Berücksichtigung der Labor-Sicherheitsrichtlinien zu verwenden.

Hintergrund

Die Coronavirus-Infektion (COVID-19) wird durch das „severe acute respiratory syndrome coronavirus 2“ (SARS-CoV-2) ausgelöst. Es wurde erstmals im Dezember 2019 in Wuhan, China, beschrieben. Am 30. Januar 2020 wurde das SARS-CoV-2 von der WHO als Bedrohung für die weltweite Gesundheit eingestuft und am 11. März 2020 zur Pandemie erklärt.

Das SARS-CoV-2-Virus hat einen RNA-Einzelstrang mit positiver Polarität (+ssRNA); es gehört als Coronavirus zur Untergruppe der Sarbecoviren (beta-CoV lineage B).

Das hochinfektiöse Virus wird hauptsächlich durch Aerosole und Tröpfchen übertragen. Neben einer Vielzahl an Symptomen kann es akute, grippeähnliche Infektionen des Respirationstrakts verursachen, mit teils schweren bis tödlichen Folgen. Zudem können ebenfalls asymptomatische oder mildverlaufende Infektionen auftreten, teilweise auch mit untypischen Symptomen.

Testprinzip

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 basiert auf dem Prinzip der LAMP (1). Der Assay dient dem direkten qualitativen RNA-Nachweis des neuartigen Coronavirus SARS-CoV-2 in humanen Proben aus dem Respirationstrakt (pharyngeale Probenabstriche, endotracheale Aspirate, bronchoalveoläre Lavage).

Im MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP Assay wird durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT) die virale RNA in eine cDNA transkribiert und mittels einer Loop-vermittelten isothermalen Amplifikationsreaktion vervielfältigt. Die Verwendung neuartiger „Mediator Displacement Probes“ in Verbindung mit universellen Reportern (2) erlaubt ein Real-Time Multiplexing der spezifischen Targetsequenzen.

Das Kit enthält alle für eine RT-LAMP-Reaktion nötigen Komponenten (spezifische Primer, Probes, universelle Reporter, dNTPs, Puffer, eine DNA-Polymerase mit „strand displacement“-Aktivität sowie eine reverse Transkriptase). Ferner sind im Kit eine Extraktionskontroll-RNA (EC) und eine interne Inhibitionskontroll-RNA (IC) enthalten. Diese dienen der Überprüfung der Probenvorbereitung (Extraktion) bzw. dem Nachweis einer möglichen Inhibition der Amplifikationsreaktion.

Die SARS-CoV-2-spezifische Targetsequenz des N-Gens wird amplifiziert und im roten Kanal (Cy5) detektiert, eine weitere SARS-CoV-2-spezifische Targetsequenz des RdRp-Gens wird im orangenen Kanal (ROX) gemessen. Die Amplifikation der IC- oder EC-Targetsequenz wird im grünen Kanal (FAM) detektiert.

Für die isothermale Amplifikation und Detektion können gängige Real-Time-PCR-Cycler verwendet werden oder entsprechend programmierbare Real-Time Heizblöcke, welche für die Detektion der Fluoreszenzsignale ausgerüstet sind.

Die amplifizierten Produkte können innerhalb von 45 Minuten detektiert werden.

Komponenten

Die Kitreagenzien reichen für 100 Tests.

Tabelle 1:

Abkürzungen	Inhalt	Volumen/Röhrchen	Deckelfarbe	Zusätzliche Information
CONTROL +	Positivkontrolle	1x 200 µL	rot	Lyophilisiert, vor Gebrauch zu rekonstituieren
CONTROL IC	Inhibitionskontrolle	1x 200 µL	blau	Lyophilisiert, vor Gebrauch zu rekonstituieren
CONTROL EC	Extraktionskontrolle	1x 1,1 mL	braun	Lyophilisiert, vor Gebrauch zu rekonstituieren
RM	Reaktionsmix	1x 550 µL	gelb	RTU
EM	Enzymmix	1x 270 µL	weiß	RTU
PM	Primermix	1x 550 µL	violett	RTU
DM	Farbstoffmix	1x 55 µL	grün	RTU
RB	Rekonstitutionspuffer	2x 1 mL	transparent	RTU

Weitere verwendete Abkürzungen

RTU ready to use (gebrauchsfertig)

Zusätzlich benötigte Materialien

- Geeignete Real-Time-PCR-Cycler oder andere Geräte, die für die isothermale Nukleinsäureamplifikation und Fluoreszenzdetektion geeignet sind (s. Tabelle 2).
- Geeignete DNA/RNA-Extraktionssysteme oder Kits (s. Tabelle 2)
- RNase-freie Materialien, wie Reaktionsröhrchen, kalibrierte volumenverstellbare Pipetten, Filterspitzen (für Pipetten)
- Wasser in einer für die Molekularbiologie deklarierten Qualität (DNase/RNase frei)
- Geeignete Reaktionsgefäße für den jeweiligen Cyclertyp oder 96-well Platte mit entsprechender Abdeckung
- Vortexgerät
- Tischzentrifuge mit einem Rotor für 1,5 mL Reaktionsgefäße
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterstreifen oder Mikrotiterplatten, falls 96-well Reaktionsplatten verwendet werden
- Verstellbare Präzisionspipetten für molekularbiologisches Arbeiten
- Kühlblock oder Eis
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Schutzausrüstung für Personal

Tabelle 2: Empfohlene Real-Time-PCR-Cycler, Extraktionskits

Real-Time PCR Hersteller	Modell
MAST	MAST ISOPLEX® MD 12
Qiagen	RotorGene 4-plex oder mit weiteren Filteroptionen
Qiagen	Tubescanner TS 2.4
Agilent	Aria Mx System
Applied Biosystems	ABI 7500
Biorad	CTX96 Deep Well / Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler 480 Instrument II
DNA- / RNA-Extraktionssysteme, Hersteller	Bezeichnung
MAST	MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit
Analytik Jena	innuPREP AniPath DNA / RNA Kit - KFFLX
Qiagen	QIAamp viral RNA mini kit
Seegene	Allplex™

Transport, Lagerung und Haltbarkeit nach erstem Öffnen

- Das MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 Kit wird auf Trockeneis oder mit Kühlpacks verschickt. Die Kitkomponenten sollten gefroren am Ziel eintreffen. Sofern Kitkomponenten aufgetaut eintreffen oder Gefäße während des Transports beschädigt wurden, lokalen Händler kontaktieren.
- Alle Reagenzien **bei $\leq -20\text{ °C}$** lagern und nach dem ersten Öffnen innerhalb von **6 Wochen** aufbrauchen. Ausnahme: IC, EC und PC nach Rekonstitution 3 Tage bei $\leq -20\text{ °C}$ lagern. Für längere Lagerung wird eine Aufbewahrung bei $\leq -80\text{ °C}$ für bis zu 3 Wochen empfohlen. Generell wird eine Aliquotierung der Kontrollen empfohlen, um multiple Auftauzyklen zu vermeiden.
- Wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen der Reagenzien (RM, PM, EM, DM, IC, PC) vermeiden, da dies die Leistungsfähigkeit des Assays beeinflussen kann. Kit-Reagenzien **nach 4 Gefrier-Auftau-Zyklen nicht mehr verwenden**.

Warnhinweise

- Halten Sie die allgemeinen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien für die Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien ein. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und benutzen Sie geeignete Laboreinrichtungen.
- Die Reagenzien des MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 Kits sind sehr empfindlich, daher sind Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um Reagenzien und Proben vor Kontamination zu schützen. Verwenden Sie keine kontaminierten Reagenzien. Reagenzien mit beschädigten Flaschen oder Verpackungen sollten aufgrund des Kontaminationsrisikos nicht verwendet werden.
- Das Kit und seine Bestandteile enthalten keine infektiösen Materialien. Der Benutzer muss jedoch beim Umgang mit Patientenproben vorsichtig sein, da diese infektiöse Organismen und Viren enthalten können.
- Einzelne Kitreagenzien enthalten bovine Komponenten. Zum Schutz vor Infektionen mit Prionen oder zoonotischen Erregern müssen die gängigen Arbeitsschutzregeln (GLP) eingehalten werden.

Vorsichtsmaßnahmen

- Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Ändern Sie das Verfahren nicht ohne vorherige Validierung.
- Keine Kitreagenzien nach dem Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
- Keine Kitreagenzien aus verschiedenen Chargen kombinieren.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien mit Ausnahme des Enzymmixes durch leichtes Schütteln (z.B. Vortexer) gründlich gemischt werden.
- In Übereinstimmung mit der Guten Laborpraxis (GLP) sollten alle Laborgeräte regelmäßig auf ihre Richtigkeit und Präzision überprüft werden.
- Es wird empfohlen, bei der Arbeit mit dem Kit, den Kitkomponenten und den Probenmaterialien Schutzkleidung zu tragen, z. B. Laborkittel, Schutzhandschuhe und Schutzbrille. Regionale und arbeitsplatzspezifische Vorschriften müssen beachtet werden.
- Die Reaktionsgefäße sind nach Zugabe der Reagenzien stets verschlossen zu halten.
- Um eine Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden, darf ein Fläschchen nach der Amplifikation niemals in der Umgebung geöffnet werden, in der Probenvorbereitung oder Mastermixe hergestellt werden!

Entsorgung

- Die Röhrchen sollten nach Gebrauch ungeöffnet und gemäß den örtlichen Richtlinien entsorgt werden. Potenziell infektiöses Material sollte vor der Entsorgung inaktiviert werden.

Testdurchführung

Probennahme und -vorbereitung

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 dient zur Testung extrahierter RNA aus humanem, respiratorischen Probenmaterial (pharyngeale Probenabstriche, bronchoalveoläre Lavage, endotracheales Aspirat).

RNA Extraktion

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 wurde an extrahierten Proben validiert. Der Assay wurde nicht an Probenmaterial ohne Extraktion validiert. Alternative Nukleinsäure-Extraktionssysteme und -kits können ggf. auch verwendet werden, sofern das Verhältnis der Absorption A 260 / A280 nm zwischen einem Wert von 1,8 bis 2,0 liegt.

Vorbereitung der Positiv-, Inhibitions- und Extraktionskontrolle

Positivkontrolle

Das Reagenz durch kurzes Anzentrifugieren auf den Boden des Röhrchens bringen. **200 µL RB** in das **PC-Röhrchen** pipettieren, das Gesamtvolumen beträgt somit 200 µL. Dieses in 10-µL-Aliquots aufteilen und bei ≤ -20 °C einfrieren (siehe Lagerungsbedingungen).

Vor Gebrauch **90 µL Wasser** (Qualität: Molekularbiologie) zu den Aliquots geben, um ein Gesamtvolumen von 100 µL zu erhalten. **12 µL** der so verdünnten **PC** für einen Reaktionsansatz einsetzen.

Inhibitionskontrolle

Das Reagenz durch kurzes Anzentrifugieren auf den Boden des Röhrchens bringen. **200 µL RB** in das **IC-Röhrchen** pipettieren, das Gesamtvolumen beträgt somit 200 µL. Dieses in 10-µL-Aliquots aufteilen und bei ≤ -20 °C einfrieren (siehe Lagerungsbedingungen).

1 µL des Aliquots zu jedem Reaktionsansatz geben.

Extraktionskontrolle

Das Reagenz durch kurzes Anzentrifugieren auf den Boden des Röhrchens bringen. **1,1 mL RB** in das **EC-Röhrchen** pipettieren, das Gesamtvolumen beträgt somit 1,1 mL. Dieses in Aliquots aufteilen und bei ≤ -20 °C einfrieren (siehe Lagerungsbedingungen).

Hinweis: Die Verwendung der EC ist eine Option in der prä-analytischen Probenvorbereitung. Die EC kann dem Lysisbuffer bei der Nukleinsäureextraktion zugegeben werden.

Pro Probe werden **10 µL der EC** für die Nukleinsäureextraktion benötigt. Dieses Volumen zum Lysisbuffer pipettieren.

Vorbereitung des Master-Mix

Hinweis:

- Nur Reaktionsgefäße verwenden, die für das verwendete Amplifikations-Gerät empfohlen werden.
- Sicherstellen, dass die Reaktionsgefäße vor Verwendung keine Kratzer oder Risse aufweisen.
- Während der Assaydurchführung sollten die Reagenzien auf Eis oder in einem Kühlblock gelagert werden.
- Reagenzien, die dem Kit entnommen werden, auf Eis auftauen lassen.
- Wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen vermeiden.
- Reagenzien nicht zu kräftig im Reaktionsgefäß mischen.
- Enzym-Mix (EM) nicht vortexen.
- Reagenzien vor direktem Sonnenlicht schützen.

In ein steriles DNA-/RNA-freies Reaktionsgefäß Zugabe von:

Reagenz	1 rxn*	10 rxn	25 rxn	50 rxn	96 rxn
RM 5x	5,00 µL	50 µL	125 µL	250 µL	480 µL
PM	5,00 µL	50 µL	125 µL	250 µL	480 µL
DM	0,50 µL	5 µL	12,5 µL	25 µL	48 µL
Total	10,50 µL	105 µL	262,5 µL	525 µL	1008 µL

* rxn: Reaktion

Master-Mix bei **95 °C für 10 min** inkubieren.

Danach den Master-Mix für **5 min auf Eis** stellen.

Reaktionsgefäß kurz anzentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Deckel zu bekommen.

Pro Reaktion **2,5 µL des Enzym-Mix (EM) zum Master-Mix** pipettieren.

Pro Reaktion **1 µL der internen Kontrolle (IC) zum Reaktionsmix** pipettieren. Vorsichtig durch kurzes, pulsartiges Vortexen mischen.

Reagenz	1 rxn	10 rxn	25 rxn	50 rxn	96 rxn
Master-Mix	10,50 µL	105 µL	262,5 µL	525 µL	1008 µL
EM	2,50 µL	25 µL	62,5 µL	125 µL	240 µL
IC*	1 µL	10 µL	25 µL	50 µL	96 µL
Gesamt	14 µL	140 µL	350 µL	700 µL	1344 µL

* Keine IC zum Master-Mix geben, falls eine EC für die Nukleinsäureextraktion verwendet wurde! Das fehlende Volumen der IC (1 µL / Reaktion) ist zu vernachlässigen.

14 µL des fertigen Master-Mix in ein für die Amplifikation geeignetes Reaktionsgefäß pipettieren.

Reaktionsgefäß kurz zentrifugieren, um die gesamte Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln.

Zugabe von **12 µL Probe** zu jedem Master-Mix. Gesamtvolumen pro Reaktion: 26 µL.

Positivkontrolle: Es wird empfohlen, eine Positivkontrolle bei jeder Testung durchzuführen, mindestens jedoch einmal pro Tag.

12 µL PC dafür in ein separates Reaktionsgefäß zum Master-Mix pipettieren.

Negativkontrolle: Falls Negativkontrollen mitgeführt werden sollen, **12 µL** des RB-Puffers oder destilliertes Wasser dafür verwenden. Entsprechendes Amplifikations-Gerät einstellen und die Amplifikation starten.

Geräte Setup

- Programm für isothermale Amplifikationsreaktion auf PCR- oder LAMP-Gerät auswählen
- Die Amplifikationstemperatur auf **61 °C** einstellen
- Reaktionszeit auf **45 min** einstellen
- FAM, Cy5 und ROX als Filter auswählen
- Die Messung des Fluoreszenzsignals auf alle 30 oder 60 Sekunden einstellen

Kontrollverfahren

Jeder Reaktionsansatz sollte entweder eine IC- oder EC-Kontrolle enthalten, um das korrekte Amplifikationsverhalten erkennen zu können.

Bei positiven Reaktionen des N- und / oder RdRp-Gens kann die IC- / EC-Kontrolle ein Reaktionssignal zeigen, jedoch ist das Testergebnis ebenfalls valide, falls die Inhibitions- bzw. Extraktionskontrolle bei positiver Reaktion kein Signal generiert.

Das korrekte Signalverhalten der IC ist aus dem chargenspezifischen Analysezertifikat ersichtlich.

Interpretation der Ergebnisse

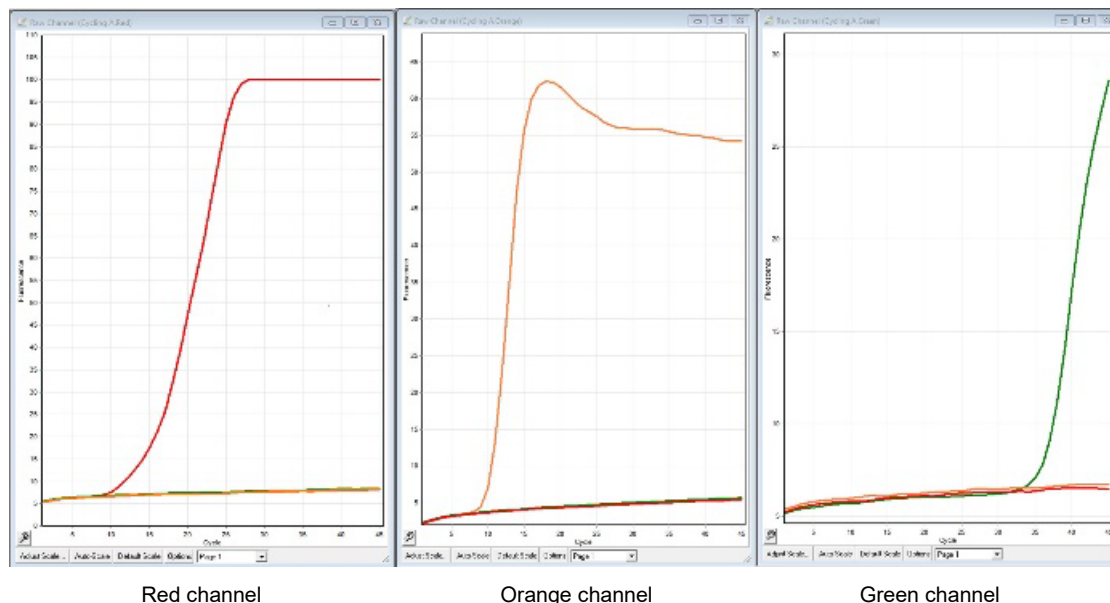


Abb. 1: Typische Amplifikationsplots

Positives Testergebnis:

Ein positives Ergebnis weist eine vom Hintergrund aus exponentiell ansteigende Amplifikationskurve auf. Siehe Abb. 1.

Eine positive Reaktion kann ein Fluoreszenzsignal im N-Gen und RdRp-Gen generieren. Ein Signal nur einer Zielsequenz – entweder N- oder RdRp-Gen – gilt ebenfalls als positives Ergebnis.

Die Reaktion der internen Kontrolle führt in den meisten Fällen zu einer positiven Amplifikation. Sollte bei Reaktivität des N- und / oder RdRp-Gens kein IC Signal detektierbar sein, so ist das positive Ergebnis trotzdem gültig.

Negatives Testergebnis:

Bei einer richtig-negativen Reaktion muss stets eine Reaktion der IC oder EC stattfinden, um sicherzustellen, dass keine Inhibition vorliegt.

Proben mit negativem Ergebnis zeigen im Amplifikationsgraph eine flache Linie entlang der X-Achse; ein leichter, stetiger Anstieg dieser Kurve ist negativ zu bewerten. Die Probenqualität kann zu einem höheren Hintergrund führen, was einen Anstieg des Signals verursachen kann. Bei diesem kontinuierlichen Anstieg kommt es jedoch zu keinem Peak. In Abb. 1 wird dies beispielhaft durch die flachen Kurven in jedem Kanal gezeigt. Ein leichter, stetiger Anstieg dieser Kurven (ramping effect) steht nicht für ein positives Signal.

Tabelle 3: Interpretationskriterien

FAM IC / EC	Cy5 N-Gene	ROX RdRp-Gene	Testergebnis	Lauf
+	+	+	positiv	gültig
+	-	+	positiv	gültig
+	+	-	positiv	gültig
-	+	+	positiv	gültig
-	-	+	positiv	gültig
-	+	-	positiv	gültig
+	-	-	negativ	gültig
-	-	-	Nicht auswertbar	ungültig

Limitierungen des Verfahrens

Der MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP-Assay dient dazu, Patienten in einem frühen Stadium der Infektion zu detektieren, wenn die Viruslast hoch ist.

Der Assay dient nicht speziell dazu, Patienten nach ihrer infektiösen Phase zu detektieren, wenn die Viruslast geringer ist.

Hohe Viruslasten (Ct-Werte ≤ 25) treten für gewöhnlich in der prä-symptomatischen (1-3 Tage vor Symptombeginn) und in der früh-symptomatischen Phase der Erkrankung auf (innerhalb der ersten 5-7 Tage der Krankheit) (2,3).

Ergebnisse des RKI zeigen, dass der Verlust der Kultivierbarkeit in Zellkultur mit RNA-Mengen < 250 Kopien assoziiert ist. Dieser Wert wurde mittels Real-Time-PCR bestimmt und entspricht einem Ct-Wert > 30 (4).

Der Assay wurde nicht mit Probenmaterial aus Sputum und Stuhl validiert.

Alle Testergebnisse müssen unter Einbeziehung klinischer Informationen sowie Informationen zur Prävalenz von COVID-19 interpretiert werden. Im Zweifelsfall müssen Daten anderer Tests für eine endgültige Diagnose mit in Betracht gezogen werden. Ein negatives Testergebnis kann auftreten, wenn die Viruskonzentration in der Probe unter dem Detektionslimit des Tests liegt oder Probennahme / -transport unsachgemäß durchgeführt wurde. Somit schließt ein negatives Testergebnis die Möglichkeit einer SARS-CoV-2-Infektion nicht aus.

Positive Testergebnisse schließen eine Koinfektion mit anderen Erregern nicht aus. Aufgrund negativer Testergebnisse kann eine Infektion mit anderen Coronaviren weder ein- noch ausgeschlossen werden.

Ein positiver und negativer prädiktiver Wert ist stark von der Prävalenz abhängig: Falsch-negative Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Prävalenz der Erkrankung hoch ist. Falsch-positive Ergebnisse sind wahrscheinlicher, sofern die Prävalenz moderat bis niedrig ist.

Leistungsmerkmale

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 detektiert RNA-Zielsequenzen der N- und RdRp-Genregion.

Hinweise zu falsch-negativen und falsch-positiven Testergebnissen

Falsch-positive Ergebnisse:

Falsch-positive Ergebnisse sind von richtig-positiven schwer zu unterscheiden, da die Signale wie die richtig-positive aussehen. Mögliche Gründe hierfür sind:

- Falsch-positive Ergebnisse können in seltenen Fällen am Ende der Amplifikationsreaktion auftreten. Dies kann bedingt sein durch Primer-Multimere, die eine Amplifikationsreaktion starten.
- Kreuzkontaminationen können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Selbst Aerosole, die das Amplifikationsprodukt durch die Luft transportieren, können so falsch-positive Reaktionen bedingen.

Falsch-negative Ergebnisse:

Falsch-negative Reaktionen sind solche, die ein IC-Signal generieren, jedoch eine Reaktion mit dem N- und / oder RdRp-Gen ausbleibt. Mögliche Gründe hierfür sind:

- Probenvolumen $< 12 \mu\text{L}$
- Virale RNA-Kopien liegen unter der Nachweisgrenze (LOD) von 75 Kopien.
- IC (deutlich größeres Volumen als $1 \mu\text{L}$ pro Reaktion) konkurriert mit den SARS-CoV-2 N- und RdRp-Targets und verzögert dadurch deren Amplifikation für ein positives Signal innerhalb der Reaktionszeit.
- Abweichende Amplifikationstemperatur

Anmerkungen zu Virusmutanten

Die bekannten Polymorphismen treten vorwiegend im Spike-Protein auf. Der MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 verwendet für den Nachweis Zielsequenzen des N- und RdRp-Gens. Somit werden Proben detektiert, die die bekannte Mutante der Linie B.1.1.7 (501Y.V1) enthalten. Auch durch andere Mutationen die im S-Gen liegen z.B. $\Delta\text{H69}/\Delta\text{H70}$ wird der Testkit nicht beeinflusst. Dieses Kit ist jedoch kein spezifischer Typisierungssassay für die genannten Mutanten.

Leistungsdaten des Assays

Diagnostische Leistungsmerkmale

Zur Evaluierung der diagnostischen Leistungsfähigkeit wurde ein Kollektiv von 241 negativen und 171 positiven Proben analysiert. Die Proben wurden von einem Krankenhauslabor gesammelt und durch Ringversuchsproben ergänzt.

Der Assay detektiert das Virus der britischen SARS-CoV-2 Variante B.1.1.7, er zeigt hier ein positives Ergebnis in der N- und / oder RdRp-Reaktion.

Die Proben wurden mittels RT-PCR gemessen und die Ergebnisse mit der MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP verglichen.

	Bezogen auf RT-PCR
Sensitivität	98 %
Spezifität	99 %
Positiver prädiktiver Wert	98 %
Negativer prädiktiver Wert	99 %
Effizienz	99 %

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 zeigt die beste Leistung bei Patientenproben aus der präsymptomatischen und symptomatischen Infektionsphase. Eine Person kann hoch infektiös sein, noch bevor klinische Symptome auftreten.

Die Sensitivität des MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 nimmt ab, wenn nur Kleinstmengen viralen Materials vorhanden sind. Solche Ergebnisse treten meist in der nicht-infektiösen Phase der Genesung auf. (3, 4)

Analytische Sensitivität

Nachweisgrenze (LOD = Limit of Detection): 75 Viruskopien pro Reaktion

Präzision

Intra-Assay Präzision in %:

FAM	Cy5	ROX
1.01-2.51 %	2.95-3.92 %	1.00-1.33 %

Inter-Assay Präzision in %:

FAM	Cy5	ROX
4.15 %	11.21 %	4.57 %

Rückverfolgbarkeit

Es wurde intern ein Kontrollplasmid sowie eine Kontroll-RNA definiert, welche innerhalb von 7-20 Min amplifiziert werden. Dieses Referenzmaterial wird für die Kalibration der Reaktionszeit, der korrekten Reaktivität der RT-LAMP-Primer sowie der Enzymaktivität benötigt.

Messbereich

Der Messbereich hängt von der Signalstärken-Einheit des jeweiligen Messgeräts ab und kann nicht verallgemeinernd angegeben werden.

Biologische Kreuzreaktionen

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 wurde mit den folgenden Organismen getestet, es kam dabei zu keinen Kreuzreaktivitäten:

- HRSV A2 Extract
- HRHV Extract
- HAV Extract
- Mycobacterium tuberculosis DNA
- Streptococcus pneumoniae DNA
- Streptococcus pyogenes
- Chlamydia pneumoniae DNA
- Mycoplasma sp.
- Bordetella pertussis DNA
- Bordetella parapertussis DNA
- Haemophilus influenzae DNA 4690
- Haemophilus influenzae DNA 11970
- Haemophilus parainfluenzae DNA
- Candida albicans DNA
- Staphylococcus epidermidis DNA
- Staphylococcus saprophyticus subsp. Saprophyticus
- Klebsiella pneumoniae
- Respiratorisches Panel, die Tupferproben enthalten: Influenza H1N1, Influenza H3N2, Infuenza B, Respiratory Syncytial Virus A
- Respiratorisches Panel, die Tupferproben enthalten: Coxsackie negatives Probenmaterial

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE**

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 is an in vitro diagnostic kit for qualitative detection of the novel Corona virus SARS-CoV-2 RNA in human respiratory samples. It is intended to be used as an aid in the early diagnosis of SARS-CoV-2 infection in symptomatic patients or individuals suspected of COVID-19. MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 is for professional use by qualified personnel in appropriately equipped laboratories following the guidelines on laboratory safety.

Background

Coronavirus disease (COVID-19), which is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was first identified in December 2019 in Wuhan, China. On 30 January 2020, SARS-CoV-2 was designated a Public Health Emergency of International Concern by the WHO and on 11 March 2020 the WHO declared it a pandemic.

SARS-CoV-2 is a positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) virus, with a single linear RNA segment and belongs to the broad family of viruses known as coronaviruses and therein to the subgenus Sarbecovirus (beta-CoV lineage B).

The highly contagious virus is transmitted mainly via aerosols and droplets. It can cause acute respiratory infections with flu-like symptoms with severe to fatal consequences. However also asymptomatic or mild infections or other atypical symptoms have been reported.

Principle of the examination method

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 is based on the LAMP assay principle (1). The assay is designed to detect the novel Coronavirus SARS-CoV-2 RNA in human respiratory samples (pharyngeal swab samples, endotracheal aspirate, bronchoalveolar lavage).

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP combines a reverse transcriptase (RT) reaction to convert viral RNA into cDNA with an isothermal loop-mediated amplification. The utilization of the novel mediator displacement probes together with universal reporters (2) allows a real-time multiplexing of the specific target sequences.

The kit contains all the components necessary for a RT-LAMP reaction (specific primers, probes, universal reporters, dNTPs, buffer, DNA polymerase with strand displacement activity and reverse transcriptase) as well as an Extraction Control RNA and internal Inhibition Control RNA (IC), respectively, to monitor the sample preparation (extraction) and/or identify a possible inhibition of the amplification reaction.

The SARS-CoV-2 specific target sequence of the N gene is amplified and detected in the red channel (Cy5), SARS-CoV-2 specific target of the RdRp gene is amplified measured in the orange channel (ROX), IC or EC target sequence is amplified and detected in the green channel (FAM).

For isothermal amplification and detection standard real-time PCR instruments can be used or specific programmable real-time heat blocks capable to read fluorescent signals.

The amplified product can be detected within 45 minutes.

Components

The reagents of one kit are sufficient for 100 tests.

Table 1:

Kit code	Content	Volume	Lid colour	Additional packaging information
CONTROL+	Positive Control	1x 200 µL	red	Lyophilized, to be reconstituted before use
CONTROL IC	Internal Control	1x 200 µL	blue	Lyophilized, to be reconstituted before use
CONTROL EC	Extraction Control	1x 1.1 mL	brown	Lyophilized, to be reconstituted before use
RM	Reaction Mix	1x 550 µL	yellow	RTU
EM	Enzyme Mix	1x 270 µL	white	RTU
PM	Primer Mix	1x 550 µL	purple	RTU
DM	Dye Mix	1x 55 µL	green	RTU
RB	Reconstitution Buffer	2x 1 mL	transparent	RTU

Further abbreviations

RTU ready to use

Additional required equipment

- Appropriate real-time PCR instrument or equipment capable of isothermal nucleic acid amplification and detection of amplified products using fluorescence (see Table 2 for suitable instruments)
- Appropriate nucleic acid extraction system or kit (see Table 2)
- Standard RNase free supplies such as reaction tubes, pipette tips with filters
- Molecular grade water (DNase / RNase free)
- Appropriate reaction tubes for cycler model or 96 well reaction plates with corresponding closing material
- Vortex mixer
- Desktop centrifuge with rotor to hold 1.5 mL assay reaction tubes
- Centrifuge with rotor for microtiter plates, if using 96 well reaction plates
- Ice bucket with ice or cold block
- Disposable powder-free gloves
- Adjustable calibrated pipettes
- Personal protective equipment

Table 2: Recommended Real-time PCR equipment, consumables / extraction kits

Real-time PCR Manufacturer	Model
MAST	MAST ISOPLEX® MD 12
Qiagen	RotorGene 4-plex or higher
Qiagen	Tubescanner TS 2.4
Agilent	Aria Mx System
Applied Biosystems	ABI 7500
Biorad	CTX96 Deep Well / Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler 480 Instrument II
Nucleic acid extraction system	Type
MAST	MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit
Analytik Jena	innuPREP AniPath DNA / RNA Kit – KFFLX
Qiagen	QIAamp viral RNA mini kit
Seegene	Allplex™

Transport, Storage and Shelf Life after First Opening

- MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 kit is shipped on dry ice (or cool packs). The components of the kit should arrive frozen. If one or more components are not frozen upon receipt, or if tubes have been compromised during shipment, contact your local distributor for assistance.
- All reagents should be stored at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ and **used up within 6 weeks** after first opening of the vials. **Exception:** Store IC, EC and PC after reconstitution at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ for 3 days. For long term (up to 3 weeks) storage at $\leq -80^{\circ}\text{C}$ is recommended. In general, aliquoting of controls is recommended to avoid multiple thawing cycles.
- Repeated freeze and thaw cycles of reagents (RM, PM, EM, DM, IC, PC) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. Kit reagents shall not be used after **4 freeze-thawing cycles**.

Warnings

- Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
- The reagents of the MAST ISOPLEX® SARS-CoV2 Kit are very sensitive, therefore take precautions to protect reagents and samples from contamination. Do not use contaminated reagents. Do not use reagents with damaged bottles or packaging.
- The kit and its components do not contain any infectious materials. The user, however, must take care when handling patient samples, because they may carry infectious organisms and viruses.
- The kit reagents may contain bovine components. To protect against infections with prions or zoonotic pathogens, standard occupational safety regulations (GLP) must be observed.

Precautions

- Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure without prior validation.
- Do not use reagents beyond the expiry date.
- Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
- Before pipetting, all reagents **except the enzyme mix EM** should be mixed thoroughly by gentle agitation (pulse-shock vortex).
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision.
- It is recommended to wear protective clothing e.g. lab coat, protective gloves and goggles while working with the kit, kit components and sample materials. Regional and workplace specific regulations must be observed.
- Reaction tubes should be kept closed at all times following addition of reagents.
- To avoid any contamination with the amplified product never open a vial after amplification in the environment where sample preparation or master mixes are prepared!

Disposal

- The tubes should be disposed of unopened after use and according to local guidelines. Potential infectious material should be inactivated before disposal.

Procedure

Specimen collection and preparation

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 is intended for use with RNA extracted from human respiratory samples (pharyngeal swab samples, endotracheal aspirate, broncho alveolar lavage).

RNA Extraction

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 was validated on samples after nucleic acid extraction. The assay is not validated on non-extracted specimen. Alternative nucleic acid extraction systems and kits might also be appropriate as long as the absorbance ratio A 260 / A280 nm ratio is between 1.8 to 2.0.

Reconstitution of Positive, Inhibition and Extraction Control

Positive Control

Briefly spin down to collect the lyophilized material. Add **200 µL of RB** to the lyophilized **PC vial** to a total volume of 200 µL. Prepare aliquots of 10 µL and store at ≤ -20 °C (see storage conditions).

Before use add **90 µL of molecular grade water** to the aliquots to get a total volume of 100 µL.

Add **12 µL of this diluted PC** to the reaction.

Inhibition Control

Briefly spin down to collect the lyophilized material. Add **200 µL of RB** to the lyophilized **IC vial** to a total volume of 200 µL. Prepare aliquots of 10 µL and store at ≤ -20 °C (see storage conditions).

Add **1 µL** of this diluted IC into each reaction tube.

Extraction Control

Briefly spin down to collect the lyophilized material. Add **1.1 mL** of RB to the lyophilized **EC vial** to a total volume of 1.1 mL. Prepare aliquots and store at ≤ -20 °C (see storage conditions).

Note: the EC is an optional step in the pre-analytic sample processing. The EC can be added to lysis buffer needed for the nucleic acid extraction.

For nucleic acid extraction a volume of **10 µL of EC** is usually needed per sample. Add this amount to the lysis buffer.

Master Mix Preparation

Note:

- Only use reaction tubes which are recommended for your chosen amplification instrument
- Ensure reaction tubes are not scratched or cracked prior to use
- During assay set-up reagents should be kept on ice or in a cold block
- Reagents removed from kits should be placed and thawed out on ice
- Avoid repeated freeze/thawing cycles
- Do not mix reagents vigorously in the reaction tube
- Do not vortex the enzyme mix (EM)
- Protect the reagents from direct sun light

To a sterile DNase / RNase free reaction tube add:

Reagent	1 rxn*	10 rxn	25 rxn	50 rxn	96 rxn
RM 5x	5.00 µL	50 µL	125 µL	250 µL	480 µL
PM	5.00 µL	50 µL	125 µL	250 µL	480 µL
DM	0.50 µL	5 µL	12.5 µL	25 µL	48 µL
Total	10.50 µL	105 µL	262.5 µL	525 µL	1008 µL

* rxn: reaction

Incubate the Master Mix at **95 °C for 10 min.**

After heat activation, place the Master Mix tube **on ice for 5 min.**

Shortly spin the tube to collect all liquid from the lid.

Per reaction add **2.5 µL of Enzyme Mix (EM)** into the Master Mix tube.

Per reaction add **1 µL of Internal Control (IC)** into the Master Mix tube. Mix carefully by short pulse vortexing.

Reagent	1 rxn	10 rxn	25 rxn	50 rxn	96 rxn
Master-Mix	10.50 µL	105 µL	262.5 µL	525 µL	1008 µL
EM	2.50 µL	25 µL	62.5 µL	125 µL	240 µL
IC*	1 µL	10 µL	25 µL	50 µL	96 µL
Total	14 µL	140 µL	350 µL	700 µL	1344 µL

* Do not add IC to the master mix, if an EC was used for nucleic acid extraction! The missing IC volume of 1 µL per reaction can be ignored.

Dispense **14 µL of the complete master mix** into the appropriate amplification tube.

Spin the reaction tubes briefly in a mini centrifuge to collect all liquids at the bottom of the vial.

Add **12 µL of sample** to each Master Mix. Total volume per reaction: 26 µL

Positive Control reaction: It is recommended to include a positive control in each run, at least once a day.

Add 12 µL of PC to one tube.

Negative Control reaction: if negative controls are required, use **12 µL** of RB buffer or distilled water.

Prepare amplification equipment and start the amplification.

Instrument Setup

- Define a program for isothermal amplification on the PCR or LAMP instruments.
- Set amplification **temperature to 61 °C**.
- Set amplification **time to 45 min**.
- Select filters for FAM, Cy5 and ROX.
- Allow a reading of the fluorescence signal every 30 sec or 60 sec.

Control Procedure

Each reaction shall contain either an IC or EC target to prove correct assay performance.

In case of positive reactions with N and / or RdRp genes, the IC / EC may show a reaction, but the assay result is valid, too, if the signal of the inhibition or extraction control does not appear. In case of a negative reaction with N and RdRp genes the IC or EC, respectively, must show a reaction. For correct signal appearance of IC see the Certificate of Analysis supplied with each batch.

Interpretation of Results

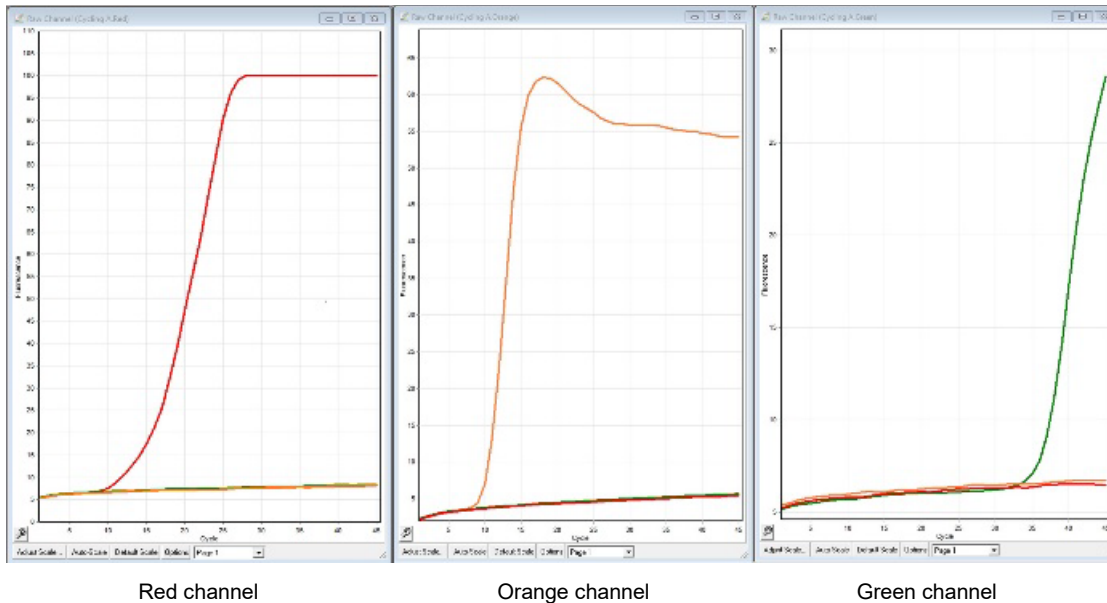


Fig 1: Typical amplification plots

Positive:

A positive result is indicated by an amplification plot rising from background exponentially. As example see figure 1.

A positive reaction may give a signal in the N gene and RdRp gene. A signal of one target alone either N or RdRp must be read as positive.

The internal control reaction shows a positive amplification in most cases. However, if the signal does not appear in the presence of a N and / or RdRp signal than the result is still valid.

Negative:

An IC or EC reaction must occur in any true negative reaction, to prove that no inhibitions occurred.

The negative amplification plot of samples shows a flat line along the x-axis, a slight continuous increase of the curve must be read as negative. Sample quality may lead to a higher background causing an increase in signal performance, however, never rising to a peak during the amplification time. As an example see in Fig. 1 the flat line in each of the channels. A slight permanent increase of the curve (ramping effect) does not mean a positive signal.

Table 3: Interpretation criteria

FAM IC / EC	Cy5 N-gene	ROX RdRp-gene	Result	Run
+	+	+	positive	valid
+	-	+	positive	valid
+	+	-	positive	valid
-	+	+	positive	valid
-	-	+	positive	valid
-	+	-	positive	valid
+	-	-	negative	valid
-	-	-	not interpretable	invalid

Limitations of the examination procedure

The MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP assay is designed to detect patients early during their infectious status when viral load is high. **The assay is not designed to be used to specifically detect patients after their infectious phase when viral load is lower.**

High viral loads (Ct-values ≤ 25) usually appear in the pre-symptomatic (1-3 days before symptom onset) and early symptomatic phases of the illness (within the first 5-7 days of illness) (2, 3). First results from the RKI website show that the loss of cultivability in cell culture was associated with an RNA amount of < 250 copies determined by real-time PCR corresponding to a Ct-value > 30 (4).

The assay has not been validated on sputum and faecal samples.

All assay results must be interpreted together with other clinical and prevalence information of COVID-19. In case of doubt other assay data must be taken into consideration for a final diagnosis. A negative result may occur if the concentration of virus in a sample is below the detection limit of the test or if the sample was collected or transported improperly. A negative test result therefore does not eliminate the possibility of a SARS-CoV-2 infection.

Positive test results do not rule out co-infections with other pathogens.

Negative test results do not prove the presence or absence of infections with other coronaviruses.

Positive and negative predicted values are highly dependent on prevalence. False negative test results are more likely when disease prevalence is high. False positive test results are more likely when prevalence is moderate to low.

Performance Characteristics

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 detects RNA targets of the N and RdRp gene region.

Comments on false positive, false negative and query results:

False positive results:

False positive are hard to detect, they look like true positive signal. Possible reasons could be:

- False positive results may occur in rare cases at the end of the amplification. They may be due to primer multimers which start to amplify.
- Cross contamination may lead to false-positive results, even aerosol carrying the amplification product reliably lead to false positive reactions.

False negative results:

False negative results are those, when the IC is giving a signal but an expected reaction with the N and / or RdRp genes fails. Such effects might be caused by:

- Sample volume $< 12 \mu\text{L}$
- Viral RNA copies are below the LOD of 75 copies
- IC (volumes significantly higher than $1 \mu\text{L}$ per reaction) compete with the SARS-CoV-2 N and RdRp target genes, delaying their reaction to become positive with the amplification time
- Incorrect amplification temperature

Notes on Virus Mutants

Today known mutations occur predominantly in the viral spike protein. In the MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 RT-LAMP assay N and RdRp gene target sequences are used for detection. Therefore samples containing the mutant line B.1.1.7 (501Y.V1) are also detected. The test kit is not affected by other mutants, too, e.g. $\Delta\text{H69}/\Delta\text{H70}$ which are also located in the S gene region. The assay, however, is not a specific typing assay for the mutants mentioned.

Assay Performance Data

Diagnostic Performance

For evaluation of diagnostic performance a similarly sized panel of 241 negative and 171 positive samples were analysed. They were collected by a hospital laboratory and supplemented with samples from external proficiency program panels.

The assay detects the virus of the British SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant, it shows a positive result in the N and / or RdRp reaction.

	Compared to RT-PCR
Sensitivity	98 %
Specificity	99 %
Positive predictive value	98 %
Negative predictive value	99 %
Efficiency	99 %

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 shows best performance in patients in the pre- and symptomatic infectious period. A person can be highly infectious before showing clinical symptoms of all kind of severity.

Sensitivity of MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 drops if only traces of viruses are present. Such results are mainly present in the non-infectious patients or during a period of convalescence. (3, 4)

Analytical Performance

Limit of detection

75 viral copies per reaction

Precision

- Intra-assay precision (%):

FAM*	Cy5	ROX
1.01-2.51%	2.95-3.92%	1.00-1.33%

- Inter-assay precision (%):

FAM*	Cy5	ROX
4.15%	11.21%	4.57%

Traceability

An in-house control plasmid and control RNA was defined to amplify within 7–20 min respectively. Such reference material is used to calibrate the assay reaction time and correct reactivity of the RT-LAMP primers and enzyme activity.

Measuring Range

The measuring range depends on the signal strength units of the respective amplification instrument and cannot be generalised.

Biological Cross-reactivity

MAST ISOPLEX® SARS-CoV-2 has been tested on the following organisms and found negative:

- HRSV A2 Extract
- HRHV Extract
- HAV Extract
- Mycobacterium tuberculosis DNA
- Streptococcus pneumoniae DNA
- Streptococcus pyogenes
- Chlamydia pneumoniae DNA
- Mycoplasma sp.
- Bordetella pertussis DNA
- Bordetella parapertussis DNA
- Haemophilus influenzae DNA 4690
- Haemophilus influenzae DNA 11970
- Haemophilus parainfluenzae DNA
- Candida albicans DNA
- Staphylococcus epidermidis DNA
- Staphylococcus saprophyticus subsp. Saprophyticus
- Klebsiella pneumoniae
- Respiratory swab panel containing: Influenza H1N1, Influenza H3N2, Influenza B, Respiratory Syncytial Virus A
- Respiratory swab panel: Coxsackie negative

Referenzen / References

1. T Notomi 1, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, T Hase; Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
2. Becherer L, Bakheit M, Frischmann S, Stinco S, Borst N, Zengerle R, von Stetten F.; Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. *Anal Chem.* 2018 Apr 3;90(7):4741-4748. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05371. Epub 2018 Mar 14.
3. WHO, Interim guidance, 11 September 2020, Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334253/WHO-2019-nCoV-Antigen_Detection-2020.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html
5. Information on infectiousness
Roa S.N., Manissero D., Steele V.R. Rareja J., A Narrative Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19
6. Heghan C., Jefferson T., Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19 in England, CEBM The Centre for Evidence-Based Medicine; weblink: <https://www.cebm.net/study/duration-of-infectiousness-and-correlation-with-rt-pcr-cycle-threshold-values-in-cases-of-covid-19-in-england/>
7. Review and overview:
https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html#doc13490982bodyText4

Änderungshistorie / Change history

Chapter	Description of change
Warnings and Precautions	Separation into two different sections Inclusion of additional points for assay handling
Disposal	Separation from warnings and precautions

**Mast Diagnostica GmbH,**

Feldstraße 20,
23858 Reinfeld,
Deutschland

Tel: +49 (0)4533 2007 0

Fax: +49 (0)4533 2007 68

email: mast@mast-diagnostica.de

Web: www.mast-group.com

Mast Group Ltd.

Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom

Tel: +44 (0)151 472 1444

Fax: +44 (0)151 944 1332

email: sales@mastgrp.com

Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic

12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France

Tél: +33 (3) 22 80 80 67

Fax: +33 (3) 22 80 99 22

email: info@mast-diagnostic.fr

Web: www.mast-group.com

Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1

Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1

Icônes utilisées selon DIN EN ISO 15223-1