

DE**Gebrauchsanweisung****ViroQ Rapid SARS-CoV-2**

Test Kit zum qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2 RNA

Elektronische Gebrauchsanweisung siehe www.bag-diagnostics.com**REF 728263 ViroQ Rapid SARS-CoV-2 96 Tests****REF 728264 ViroQ Rapid SARS-CoV-2 480 Tests**

Für die Verwendung mit		
Probentypen	RNA Extraktionskits / Automatisierte Extraktionsinstrumente	Real-time PCR Instrumente
Nasopharyngeal (NP) Abstrich	QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit / QIAcube Roche Roche MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit / MagNA Pure 96 Instrument	Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Roche LightCycler® 480 System II Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Pro Real- Time PCR 0,2 ml System
Oropharyngeal (OP) Abstrich		
Nasal Abstrich		
Anterior nasal Abstrich		
Mittlerer Nasenmuschel Abstrich		

Wichtiger Hinweis: Für manche Cycler wird eine Farbkompensation oder Farbkalibrierung benötigt. Bitte prüfen Sie die fortlaufend aktualisierte Liste auf unserer Website über die Schaltfläche „Cycler Einstellungen“: <https://www.bag-diagnostics.com/en/sars-cov-2-en.html>

Version: 3/2021 / Stand: 2021-09 Änderungen zu Version 2/2020 sind gelb markiert.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	3
2. PRODUKT BESCHREIBUNG	3
3. TEST PRINZIP	3
4. MATERIAL	3
4.1 Inhalt des ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kits	3
4.2 Zusätzlich notwendige Reagenzien und Geräte	4
4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße	4
5. LAGERUNG UND STABILITÄT	5
6. TESTVERFAHREN	5
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	5
6.2 RNA-Isolierung	5
6.3 Vorbereitung der Reagenzien	6
6.4 Amplifikation	6
6.5 Cycler Einstellungen	7
6.6 Interpretation der Ergebnisse	9
7. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE	11
7.1 Nachweisgrenze	11
7.2 Klinische Evaluation der diagnostischen Sensitivität und Spezifität	12
7.3 Kreuzreaktivität	12
8. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	13
9. GRENZEN DER METHODE	14
10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	14
11. TROUBLESHOOTING	15
12. IN DIESEM DOKUMENT/PRODUKT VERWENDETE MARKEN	15
13. ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE	16
14. LITERATUR	16

1. ZWECKBESTIMMUNG

Das ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kit wird für den qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2 RNA in Probenmaterial aus Atemwegen wie Nasopharyngeal- (NP), Oropharyngeal- (OP), Nasal-, Anterior Nasal- und mittlerer Nasenmuschel- Abstrich mittels reverser Transkription der RNA und anschließender Amplifikation in der Real-Time PCR verwendet. Der Test wird von qualifiziertem Personal in Fachlaboren durchgeführt.

2. PRODUKT BESCHREIBUNG

Das ViroQ Rapid SARS-CoV-2-Kit wird zum In-vitro-Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in Probenmaterial aus Atemwegen wie Nasopharyngeal- (NP), Oropharyngeal- (OP), Nasal-, Anterior Nasal- und mittlerer Nasenmuschel- Abstrich verwendet. Das Kit basiert auf einer Ein-Schritt-Reaktion in der Real-Time PCR-Technologie mit einem komprimierten PCR Profil (≤ 1 h). Mit einer effizienten cDNA-Synthese aus RNA in Verbindung mit einer Real-Time PCR bietet das ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kit die Möglichkeit, den Test in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Das Kit enthält Primer und fluoreszierende Sonden zur Amplifikation und zum Nachweis von Genfragmenten für SARS-CoV-2. Darüber hinaus enthält es eine interne Kontrolle zur Sicherstellung der korrekten Probennahme und erfolgreichen Amplifikation.

3. TEST PRINZIP

Der Test wird mit RNA als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die RNA wird mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt und anschließend in einer PCR amplifiziert. Die Primer wurden speziell für die selektive Amplifikation transkribierter cDNA der viralen Gene RdRP und E entwickelt (RdRP Gen: Institut Pasteur Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2; E Gen: Corman et al. 2020). Die Amplikons werden mit ebenfalls SARS-CoV-2 spezifischen fluoreszenz-markierten Hydrolysesonden (TaqMan[®]-Sonden) nachgewiesen.

Wenn Amplikons vorhanden sind, werden die Sonden durch die Taq-Polymerase hydrolysiert und ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Menge des PCR-Produkts zunimmt. Die Fluoreszenzsignale werden von der optischen Detektionseinheit des Real-Time PCR-Cycler gemessen.

Der Test wird in einer einzelnen PCR-Reaktion durchgeführt, die die beiden viralen Gene RdRP und E sowie ein universell exprimiertes menschliches Gen (Rnase P) mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farben nachweist. Der Nachweis des Rnase P Gens stellt die korrekte Probennahme, RNA-Isolierung und RT-PCR-Amplifikation sicher.

4. MATERIAL

4.1 Inhalt des ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kits

- **ViroQ|ENZYME** ViroQ Enzyme, lyophilisiert, enthält Reverse Transkriptase, Taq Polymerase, dNTPs
- **ViroQ|SOLV** ViroQ Solvent, gebrauchsfertig, enthält Rekonstitutionspuffer für das ViroQ Enzyme

- **ViroQ|MIX** **ViroQ Mix**, gebrauchsfertig, enthält Primer, Sonden, Lagerungspuffer
- **CONTROL+** **ViroQ Pos Ctrl**, positive Kontrolle, getrocknet, enthält humane RNA, Referenz RNA für das Virus
- **IFU** **or** **eIFU** **Gebrauchsanweisung oder elektronische Gebrauchsanweisung**

4.2 Zusätzlich notwendige Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur RNA Isolation (validierte RNA Isolationskits siehe 6.2)
- Real-Time Cycler (validierte Cycler siehe 4.3)
- Real-Time PCR Reaktionsgefäße mit Deckeln oder Folien (validierte Produkte siehe 4.3)
- RNase freies H₂O
- Kolbenhubpipetten (0,5 – 1000 µl) und Spitzen
- Color Compensation kit für den LightCycler® 480 I+II, 2.0 (REF 728258 ViroQ CC Light Cycler®, zur Verfügung gestellt von BAG Diagnostics)
- Color Calibration Kit für QuantStudio, StepOne, ABI 7500, ViiA7 (REF 728260 RT CC Universal Applied Biosystems® zur Verfügung gestellt von BAG Diagnostics)

4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße

Cycler	Reaktionsgefäße	Verschlussysteme
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Fa. Bio-Rad	FrameStar® Break-A-Way PCR Plate, Low Profile, 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips™ Product No. 4ti-0755/120 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
		qPCR Seal Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
	Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, Low Profile, thin wall, skirted, white/white Product No. HSP9655 Fa. Bio-Rad	0.2 ml Flat PCR Tube 8-Cap Strips, optical, ultraclear, Product No. TCS0803 Fa. Bio-Rad
LightCycler® 480 System II Fa. Roche	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white Product No. 04729692001 Fa. Roche	qPCR Seal Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR 0,2 ml System Fa. Applied Biosystems	Vari-Strip™ 8 Well PCR Tube Strips Product No. 4ti-0753 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	Crystal Strips™ Product No. 4ti-0755/120 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences
	FrameStar® 96 Well Semi-Skirted, PCR Plate, ABI® FastPlate Style, white wells, clear frame Product No. 4ti-0911 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences	qPCR seal, Product No. 4ti-0560 Fa. 4titude / Brooks Life Sciences

Besonderer Hinweis: Wenn andere Real-Time Cycler, Reaktionsgefäße und Verschlussysteme verwendet werden, müssen diese vom Benutzer validiert werden.

5. LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Kits werden bei Raumtemperatur versandt. Alle Reagenzien müssen nach Erhalt in temperaturüberwachten Geräten bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Das Haltbarkeitsdatum ist auf dem Etikett der Reagenzien angegeben. Das auf dem äußeren Etikett angegebene Haltbarkeitsdatum bezieht sich auf das Reagenz mit der kürzesten Laufzeit. Die Reagenzien ViroQ Enzyme und ViroQ Solvent können bis zum Ende der Laufzeit bei Raumtemperatur gelagert werden, solange das Lyophilisat noch nicht mit dem Rekonstitutionspuffer gelöst wurde. Nach Lösung hat es eine Haltbarkeit von 12 Monaten.

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren von bereits gelösten Reagenzien (mehr als zweimal) sollte vermieden werden, da dies die Leistung des Assays beeinträchtigen kann. Bei intermittierender Verwendung sollten die Reagenzien aliquotiert werden.

6. TESTVERFAHREN

6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Molekulargenetische Techniken sind besonders sensitive Methoden und sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal mit Erfahrung in molekulargenetischen Techniken durchgeführt werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Detektion); möglichst zwei getrennte Räume nutzen
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen.

6.2 RNA-Isolierung

Das Probenmaterial zur Isolierung der RNA muss in geeigneten Probennahme-Systemen verschickt werden. Zur korrekten Probenahme sollten die Anweisungen der WHO unter folgendem Link beachtet werden <https://www.who.int/csr/sars/sampling/en/>. Es wird empfohlen, CE IVD-zertifizierte Kits für die RNA-Isolierung zu verwenden.

Validierte RNA-Isolierungskits:

Automatisiert

- QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit
- Roche MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit

Wenn die etablierte Standardmethode des Labors für die RNA-Isolierung verwendet wird und diese nicht einem der oben validierten Kits entspricht, muss sie vom Benutzer validiert werden.

6.3 Vorbereitung der Reagenzien

ViroQ Enzyme

Der Enzymmix ViroQ Enzyme ist lyophilisiert und muss vor Gebrauch mit 400 µl ViroQ Solvent mittels Auf- und Abpipettieren gelöst werden.

ViroQ Pos Ctrl

Die Positivkontrolle ViroQ Pos Ctrl ist getrocknet und muss mit 30 µl RNase freiem H₂O mittels Auf- und Abpipettieren gelöst werden, 15 Minuten vollständig rehydrieren lassen und dann erneut durch gründliches Vortexen mischen.

6.4 Amplifikation

Es sollten vom Hersteller des Real-Time Cyclers empfohlene Reaktionsgefäße oder die in Kapitel 4.3 empfohlenen Materialien verwendet werden.

Für jede Probe werden die folgenden Reagenzien in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

- 4 µl ViroQ Enzyme
- 2 µl ViroQ Mix (Primer und Sonden)
- 5 µl* RNA-Probe
- 9 µl RNase freies H₂O

*Bei einer erwarteten sehr geringen Konzentration an Virus-Kopien kann das Volumen der Probe erhöht und gleichzeitig die Wassermenge verringert werden.

Das Reaktionsvolumen für jeden Real-Time PCR Test beträgt 20 µl.

Wenn ein Prämix aus ViroQ Enzyme, ViroQ Mix und RNase freies H₂O für mehr als eine Probe hergestellt wird, berücksichtigen Sie bitte eine angemessene zusätzliche Menge für Pipettierverluste.

Für das Ansetzen der **Positivkontrolle (PTC)** wird eine PCR-Reaktion vorbereitet und an Stelle der RNA-Probe die ViroQ Pos Ctrl verwendet. Für das Ansetzen einer **No Template Control (NTC)** wird Wasser anstatt RNA verwendet.

Schließen Sie die Reaktionsgefäße und vergewissern Sie sich, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäß befindet. Stellen Sie sicher, dass sich keine Blasen in den Reaktionsgefäßen befinden. Wenn Blasen vorhanden sind, tippen Sie vorsichtig mit dem Reaktionsgefäß auf die Werkbank, um die Blasen zu entfernen.

Starten Sie das PCR-Programm mit den folgenden Parametern:

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	8 min	48°C	1 Zyklus
Polymerase Aktivierung	2 min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	2 sec	95°C	42 Zyklen
Annealing + Extension	10 sec + reading	60°C	

Die folgenden Real-Time Cycler wurden für das ViroQ Rapid SARS-CoV-2-Kit validiert:

Bio-Rad: CFX96 Touch™ Real-Time PCR-Detektionssystem

Roche: LightCycler® 480 System II

Applied biosystems: QuantStudio™ 6 Pro Real-Time PCR 0,2 ml System

Bitte beachten Sie die unter [6.5 Cycler Einstellungen](#) beschriebenen Geräte spezifischen Einstellungen.

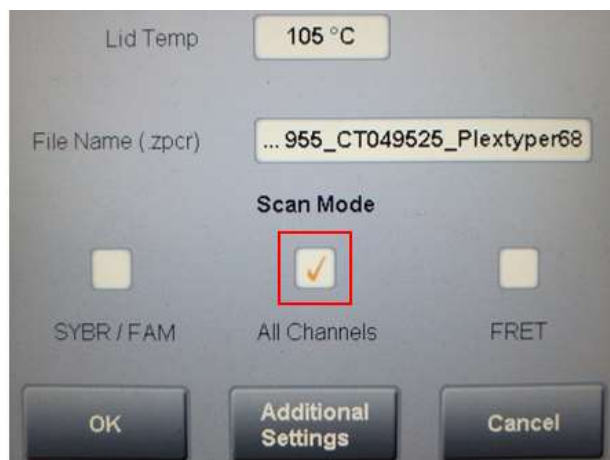
Besonderer Hinweis

Wenn andere Real-Time Cycler verwendet werden, müssen diese vom Benutzer validiert werden.

6.5 Cycler Einstellungen

Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Für die Benutzung auf dem CFX96 Touch™ müssen folgende spezifische Einstellungen gemacht werden. Vor dem Start des Laufs muss ein Haken bei „All Channels“ gesetzt werden. Die Deckeltemperatur wird auf 105°C eingestellt. Die Standard Ramp Rate wird benutzt.



Roche LightCycler® 480 II

Für die Benutzung auf dem LightCycler® 480 II müssen folgende spezifische Einstellungen gemacht werden. Beim Einprogrammieren des PCR-Programms muss die entsprechende Ramp Rate mit eingestellt werden.

Schritt	Zeit	Temperatur	Ramp rate	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	8 min	48°C	4,4°C/s	1 cycle
Polymerase Aktivierung	2 min	96°C	4,4°C/s	1 cycle
Denaturierung	2 sec	95°C	2,2°C/s	42 cycles
Annealing + Extension	10 sec + reading	60°C	2,2°C/s	

Die Filtereinstellungen müssen wie folgt gesetzt werden:

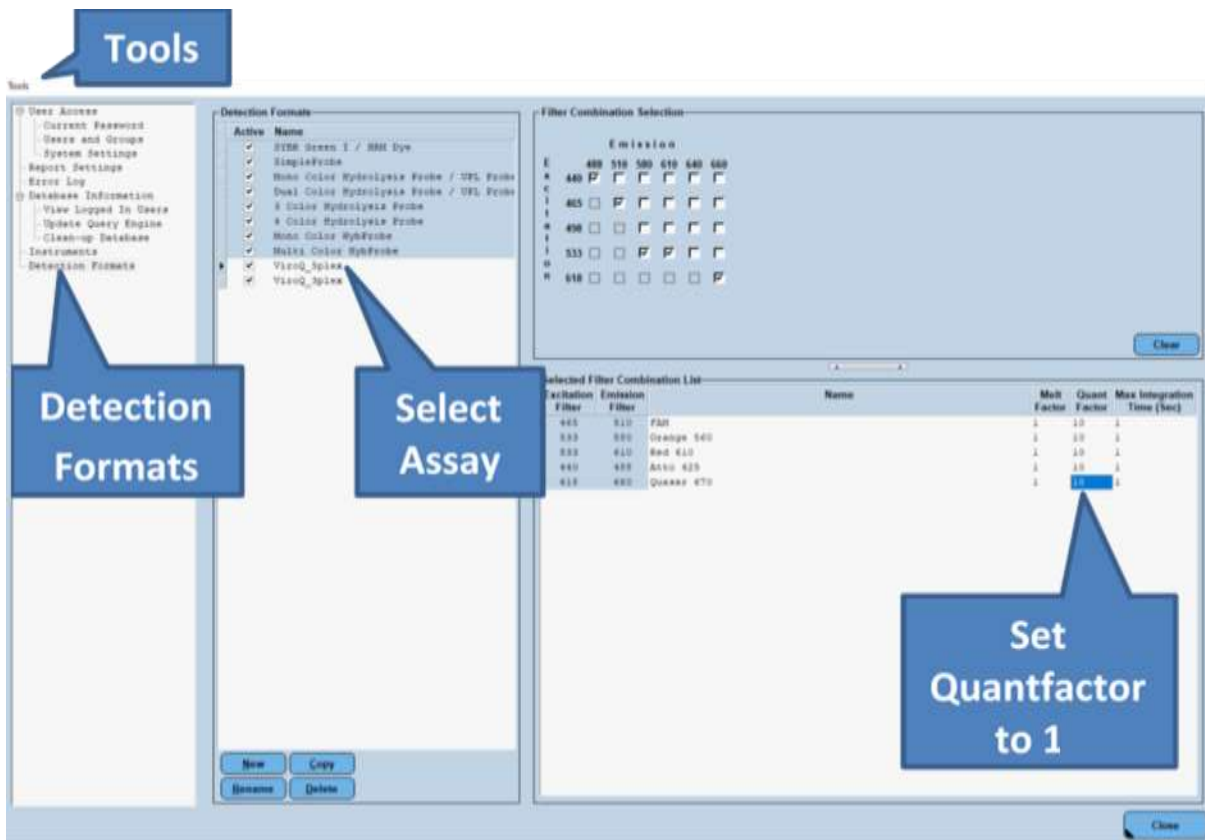
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (sec)
533	580	Orange560	1	1	1
533	610	Red610	1	1	1
465	510	FAM	1	1	1

Bei schwachen Signalen kann die Max Integration Time erhöht werden.

Um zu den Filtereinstellungen zu kommen bitte folgende Schritte ausführen:

Tools aufrufen → Detection Formats auswählen → Assay auswählen → Einstellungen vornehmen wie z.B. Quantfactor auf 1 setzen

Beispielbild mit 5 Kanälen. Für den ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Test werden nur die 3 Kanäle in der Tabelle oben verwendet.



Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast

Für die Benutzung auf dem QuantStudio™ 6 müssen folgende spezifische Einstellungen gemacht werden:

Bei „Experiment properties“ sind diese Haken zu setzen.

How do you want to identify this experiment?

* Experiment Name: 2021-02-11 000588

Barcode: _____

User Name: _____

Comments: _____

Which instrument type are you using to run the experiment?

QuantStudio™ 6 Flex System

QuantStudio™ 7 Flex System

VNA™ 7 System

Which block are you using to run the experiment?

96-Well

96-Well (0.2mL)

Fast 96-Well (0.1mL)

What type of experiment do you want to set up?

Standard Curve

Relative Standard Curve

Comparative Ct (AMC)

Genotyping

Precision/Adherence

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents

SYBR Green Reagents

Other

What properties do you want for the instrument run?

Standard

Fast

Unter dem Punkt „Define“ werden Target Name, Reporter sowie Quencher so ausgewählt wie das Labor bei der Farbkalibrierung die entsprechenden Namen vergeben hat. Folgend ein Beispiel für diese Einstellungen.

Target Name	Reporter	Quencher
FAM	FAM	NFQ-MGB
Orange560	O560_50	NFQ-MGB
Red610	RED610_C1	NFQ-MGB

Beim Einprogrammieren des PCR-Programms muss die entsprechende Ramp Rate mit eingestellt werden.

Schritt	Zeit	Temperatur	Ramp rate	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	8 min	48°C	3°C/s	1 Zyklen
Polymerase Aktivierung	2 min	96°C	3°C/s	1 Zyklen
Denaturierung	2 sec	95°C	2,2°C/s	42 Zyklen
Annealing + Extension	10 sec + reading	60°C	2,2°C/s	

6.6 Interpretation der Ergebnisse

Die Bewertung der Testergebnisse für klinische Proben sollte durchgeführt werden, nachdem die positiven und negativen Kontrollen untersucht und als gültig und akzeptabel befunden wurden. Wenn die Kontrollen nicht gültig sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

Für alle drei Reaktionen im Multiplex-PCR-Mix wird ein Ct-Cutoff verwendet, um positive Reaktionen zu definieren. Wenn der Ct-Wert nicht eindeutig ist, kann es hilfreich sein, die Fluoreszenzkurven zu überprüfen.

Alle Tests, außer der negativen Kontrolle (NTC), müssen ein Fluoreszenzsignal im roten Kanal mit der internen Kontrolle zeigen. SARS-CoV-2 positive Proben müssen ein positives Signal im FAM Kanal (RdRP Gen) oder in beiden Kanälen FAM und CFO560 / HEX / VIC / JOE (E-Gen) zeigen. Die Positivkontrolle muss in jedem Kanal ein Amplifikationssignal innerhalb der definierten Ct-Werte aufweisen.

Kanal	Spezifität
FAM	SARS-CoV-2 / RdRP Gen (RNA-dependent RNA-Polymerase)
CFO560 / HEX / VIC / JOE	Beta-CoV / E Gen (Sarbeco, Envelope)
CFR610 / Texas Red / ROX	Zellkontrolle / Rnase P

Die Amplifikationssignale für SARS-CoV-2 negative Proben sollten außerhalb der definierten Ct-Werte für beide Kanäle (grün und orange) liegen.

Die NTC wird als Kontaminationskontrolle verwendet. Wenn unbeabsichtigt RNA oder kontaminierendes Amplifikat hinzugefügt wurde, wird in der NTC ein positives Signal sichtbar. Wenn der Ct kleiner als 35 ist, sollte dies als eine mögliche Kontamination betrachtet werden. Amplifikationssignale über Ct 35 in der NTC können auf PCR Artefakten beruhen und können unter Berücksichtigung der finalen Fluoreszenz (RFU) und der Form der Amplifikationskurve ignoriert werden (s.u. zur Interpretation von Ergebnissen zwischen Ct 35 und Ct 42). Wenn eine Kontamination vermutet wird, so wird empfohlen den lokalen Richtlinien zur Dekontamination zu folgen und die Reagenzien auszutauschen.

Für gültige Ergebnisse werden alle Ct-Werte ≤ 35 als positiv bewertet (siehe Tabelle unten).

	Kanal	Ct-Level	Prüfen	Wellenlänge in nm
Zellkontrolle	Rot (CFR610)	$\leq 35^*$	$>35-42^{**}$	Anregung: 590 Emission: 610
Virus Gen RdRP	Grün (FAM)	≤ 35	$>35-42$	Anregung: 495 Emission: 520
Virus Gen E	Orange (CFO560)	≤ 35	$>35-42$	Anregung: 538 Emission: 559

* Eine hohe SARS-CoV-2 RNA-Konzentration in der Probe kann zu reduzierten oder fehlenden Zellkontrollsignalen führen.

** Ausfall dieser Kontrolle bedeutet: Unzureichende Konzentration an menschlichem Zellmaterial. Unsachgemäße Probenahme oder Probenversand.

Unabhängig vom Ct Wert sollte eine positive Reaktion eine sigmoide Amplifikationskurve und eine ausreichende finale Fluoreszenz (RFU) aufweisen. Die RFU ist abhängig vom Cycler – die finale RFU der Positivkontrolle kann als Richtwert für die normale finale RFU auf einem bestimmten Cycler herangezogen werden. Die Positivkontrolle kann auch als Beispiel für die korrekte sigmoide Form der Amplifikationskurve verwendet werden. Aufgrund dessen sollten Ergebnisse mit einem Ct Wert über 35 und niedriger finaler RFU bezüglich der sigmoiden Form der Amplifikationskurve und der Plausibilität der Reaktion geprüft werden. Proben mit uneindeutigem Ergebnis sollten wiederholt und im Kontext des klinischen Verlaufs beim Patienten interpretiert werden. Bei Fragen zur Anpassung des Thresholds oder grenzwertigen Ct Werten wenden Sie sich bitte an den Service der BAG Diagnostics (Telefon: +49 (0) 6404 925125, E-Mail: info@bag-diagnostics.com) oder Ihren Außendienstmitarbeiter.

Die folgende Tabelle zeigt die Interpretation der Amplifikationsergebnisse:

FAM RdRP Gen	CFO560 E Gen	CFR610 Zellkontrolle	Ergebnis
+	+	+*	SARS-CoV-2 spezifische RNA nachgewiesen.
+	-	+*	SARS-CoV-2 spezifische RNA nachgewiesen.
-	+	+*	Beta-CoV spezifische RNA nachgewiesen. Test wiederholen mit derselben oder neuen Probe.
-	-	+	Keine SARS-CoV-2 spezifische RNA nachgewiesen. Die Probe enthält keine nachweisbaren oder ausreichenden Mengen an Kopien (LoD) der spezifischen RNA.
-	-	-**	Ungültiges Ergebnis aufgrund von Real-Time PCR-Inhibition oder Reagenzienversagen. Wiederholen Sie die RNA Isolierung und / oder den Test mit der Originalprobe.

* Eine hohe SARS-CoV-2 RNA-Konzentration in der Probe kann zu reduzierten oder fehlenden Zellkontrollsignalen führen.

** Ausfall dieser Kontrolle bedeutet: Unzureichende Konzentration an menschlichem Zellmaterial. Unsachgemäße Probenahme, Probenlagerung oder Probenversand.

7. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Die Kombination von Primern und Sonden gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung von SARS-CoV-2-spezifischer RNA. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Spezifität des Testkits wird für jede Charge mit vorab typisierten Referenzproben überprüft.

7.1 Nachweisgrenze

Die niedrigste SARS-CoV-2-RNA-Konzentration, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% oder höher erfolgreich nachgewiesen wird, definiert die Nachweisgrenze (LoD). Die LoD wurde anhand von drei seriellen Verdünnungstufen einer Virus-Referenz RNA (AccuPlex™ SARS-CoV-2 Verification Panel) bestimmt, die jeweils in 20 Wiederholungen getestet wurden. Die analytische Sensitivität des ViroQ Rapid SARS-CoV-2 RT-PCR Tests beträgt demnach **5 Kopien / 20 µl Reaktion** für das Zielgen RdRP und **10 Kopien / 20 µl Reaktion** für das Zielgen E mit dem LightCycler® 480 II System.

7.2 Klinische Evaluation der diagnostischen Sensitivität und Spezifität

Für das ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kit wurde eine Leistungsbewertungsstudie mit 171 vortypisierten RNA-Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie wurden mit den Ergebnissen verglichen, die bei einer Testung mit dem ViroQ SARS-CoV-2 Testkit erhalten wurden. Die Studie wurde auf drei verschiedenen real time PCR Cycler durchgeführt und 45 RNA-Poben sind auf zwei dieser real time PCR Cycler getestet worden. Die endgültige Bewertung der 216 Ergebnisse für alle RNA-Proben wurde zur Berechnung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität des Tests verwendet. Hiervon wurden 4 Ergebnisse wegen unzureichendem Zellmaterial in der Probe ausgeschlossen.

Diagnostische Spezifität: 99,2%

Diagnostische Sensitivität: 97,8%

		ViroQ SARS-CoV-2	
		Positive	Negative
ViroQ Rapid SARS-CoV-2	Positive	88	1*
	Negative	2*	121

* schwache Reaktion mit spätem Ct, weil die Proben sich an der Nachweisgrenze befinden

7.3 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität der Primer mit anderen respiratorischen Viren und Bakterien wurde vom Pasteur Institut (Paris) und von Corman et al. 2020 mit bekannten positiven Proben getestet. Keiner der getesteten Organismen zeigte eine Reaktivität.

Um die analytische Spezifität und Exklusivität des ViroQ SARS CoV-2 Kits nachzuweisen, wurde ein Kontrollpanel, das 22 respiratorische Pathogene (intakte Viruspartikel und bakterielle Zellen) enthält, eingesetzt. Von jedem im Panel enthaltenem Pool (siehe Tabelle unten) wurde RNA extrahiert und mit dem ViroQ SARS-CoV-2 Kit (REF 728250, 728251) getestet. Bei keinem Pool konnte eine Reaktivität mit dem RdRP Gen oder dem E Gen nachgewiesen werden.

Respiratorisches Kontroll-Panel					
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5
Adenovirus Type 3	✓				
Coronavirus OC43	✓				
Human Metapneumovirus (Peru6-2003)**	✓				
Parainfluenza Type 2	✓				
<i>B. pertussis</i> (A639)	✓				
Coronavirus NL63		✓			
Bocavirus-Lambda (recombinant, Isolate 2)		✓			
Influenza A H1 (A/New Caledonia/20/99)		✓			
Parainfluenza Type 3		✓			
Coronavirus 229E			✓		
Rhinovirus (1A)			✓		
Influenza A H3 (A/Brisbane/10/07)			✓		
<i>C. pneumoniae</i> (CWL-029)			✓		
Influenza B (B/Florida/02/06)				✓	
Parainfluenza Type 4A				✓	
Respiratory Syncytial Virus B (CH93(18)-18)				✓	
<i>M. pneumoniae</i> (M129)				✓	
Coronavirus HKU-1 (recombinant)				✓	
Influenza A H1N1 (A/NY/02/09)					✓
Parainfluenza Type 1					✓
Respiratory Syncytial Virus A (2006 Isolate)					✓
<i>L. pneumophila</i> (Philadelphia)					✓

8. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kit wurde für in-vitro-diagnostische Zwecke entwickelt und sollte nur von entsprechend geschultem, qualifiziertem Personal verwendet werden. Alle Arbeiten sollten unter Verwendung guter Laborpraktiken durchgeführt werden.

Das Reagenz ViroQ Solvent unterliegt einer Gefahrenstoffkennzeichnung für **Warnung** und **Gesundheitsgefahren**. Weitere Informationen sind der Tabelle in Kapitel 13 zu entnehmen.

Biologisches Material, das zur Extraktion von RNA verwendet wird, z.B. Proben aus den Atemwegen sollten als potenziell infektiös behandelt werden. Beim Umgang mit biologischem Material werden geeignete Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; beim Umgang mit biologischem Material und bei der Durchführung des Tests Einweghandschuhe und Mund-Nasen-Schutz tragen; Hände nach Beendigung des Tests desinfizieren).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder

70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquots sollte vermieden werden. Der Gebrauch von sterilen Einmalpipetten und Pipettenspitzen wird empfohlen. Keine Reagenzien mit Trübung oder Anzeichen für mikrobielle Kontamination verwenden.

Ein Sicherheitsdatenblatt bzw. eine Erklärung zu Sicherheitsdatenblättern (MSDS) kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden.

9. GRENZEN DER METHODE

Mutationen oder Polymorphismen an den Primer- und Sondenbindungsstellen können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Aufgrund der hohen Anfälligkeit der Real-Time-PCR Methode für Kreuzkontaminationen ist bei der RNA-Isolierung besondere Vorsicht geboten.

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann bei diesem Produkt zu ungültigen Ergebnissen führen. Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Infektion nicht aus, da die Ergebnisse von einer geeigneten Probenentnahme, dem Fehlen von Inhibitoren und der definierten LoD abhängen.

Es ist äußerste Vorsicht geboten, um eine Kontamination der Kit-Reagenzien und anderer Labormaterialien und -geräte mit Amplikons, RNA oder DNA zu verhindern. Regelmäßige Wischtests und Negativkontrollen (NTC) mit Aqua dest. bei jedem Assay werden dringend empfohlen.

In der Negativkontrolle mit Aqua dest. darf kein Fluoreszenzsignal vorhanden sein ($C_t > N.A.$). Bei einer Signalentwicklung in der Negativkontrolle bitte Kapitel 6.5 beachten und gegebenenfalls den PCR-Arbeitsplatz dekontaminieren und bei Bedarf die Reagenzien austauschen.

Alle Instrumente (z.B. Pipetten, Real-Time Cycler) müssen gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibriert werden.

Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2 Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen für das Patientenmanagement verwendet werden. Negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, Anamnese und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.

10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Die interne Qualitätskontrolle neuer Chargen des ViroQ Rapid SARS-CoV-2 Kits kann unter Verwendung einer Kombination von RNA-Proben durchgeführt werden, von denen bekannt ist, dass sie positiv oder negativ sind. Negativkontrollen zur Erkennung möglicher Kontaminationen werden empfohlen. Verwenden Sie zu diesem Zweck eine PCR-Reaktion mit RNase-freiem Wasser als NTC.

11. TROUBLESHOOTING








Symptom	Mögliche Ursache	Mögliche Lösung
Schlechtes oder kein Signal	Anwesenheit von Inhibitoren.	Frische Reagenzien verwenden.
	Keine RNA in der Reaktion.	Test wiederholen. Auf korrektes Pipettieren achten.
	Degradierung der fluoreszierenden Sonden oder der Primer.	Frischen ViroQ Mix verwenden. Lichteinwirkung und häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden. Lagerbedingungen beachten!
	Bläschen in der PCR-Reaktion, Flüssigkeitsrückstände an der Innenwand der Reaktionsgefäße.	Sorgfältiges Pipettieren. PCR Platte kurz herunterzentrifugieren.
	Plastikware nicht kompatibel oder von niedriger Qualität	Kompatible Plastikware guter Qualität verwenden (siehe Kapitel 4.3).
	Verdampfung der Reagenzien durch falsches Verschließen der PCR Reaktionsgefäße.	Sicherstellen, dass die PCR Reaktionsgefäße richtig verschlossen sind. Vorsicht an den Kanten der Versiegelungsfolien.
Signal in der Negativkontrolle	Kontamination mit RNA oder DNA in der Negativkontrolle	Wiederholung der Negativkontrolle. Dekontamination des Arbeitsplatzes.

12. IN DIESEM DOKUMENT/PRODUKT VERWENDETE MARKEN

TaqMan® ist eine Marke von Roche Molecular Systems Inc.

Cal Fluor® ist ein registrierter Markenname der Firma LGC Biosearch Technologies.

13. ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE

	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
DRY	Getrocknet
CONT	Inhalt, enthält
CONTROL +	Positive Kontrolle
IFU	Gebrauchsinformation
or	Oder
eIFU	Elektronische Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
LOT	Lot-Nr.
LYOPH	Lyophilisiert
REF	Bestell-Nr.
ViroQ ENZYME	Enzym-Mix für ViroQ-Produkte
ViroQ MIX	Primermix für ViroQ-Produkte
ViroQ SOLV	Solvent für den ViroQ Enzym-Mix
	Warnung H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung
	Gesundheitsgefahren H371: Kann zentrales Nervensystem schädigen. Expositionsweg: Oral

14. LITERATUR

Victor M Corman, Christian Drosten et.al.(2020), Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Institut Pasteur Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website <http://www.bag-diagnostics.com>

Gebrauchsanweisungen in anderen Sprachen siehe:

<http://www.bag-diagnostics.com> oder kontaktieren Sie uns direkt unter info@bag-diagnostics.com
oder Telefon: +49 (0)6404-925-125