

DE

Gebrauchsinformation

ViroQ SARS-FluA/B-RSV

Test Kit zum qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A/B und RSV RNA

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com



REF 728267 ViroQ SARS-FluA/B-RSV 96 Tests

REF 728268 ViroQ SARS-FluA/B-RSV 480 Tests

Für die Verwendung mit		
Probentypen	RNA Extraktionskits / Automatisierte Extraktionsinstrumente	Real-time PCR Instrumente
Sputum (LRT)	QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit / QIAcube QIAGEN EZ1 Virus Mini Kit V2.0 Thermo Fisher Thermo KingFisher MagMAX Viral/PathogenNucleic Acid Isolation Kit	Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Nasopharyngeal (NP) Abstrich		
Oropharyngeal (OP) Abstrich		Roche LightCycler® 480 System II
Nasal Abstrich		Applied Biosystems QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR- System 96-Well Fast, laptop
Anterior nasal Abstrich		
Mittlerer Nasenschleim 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 „Cyclers Settings“: <https://www.bag-diagnostics.com/en/sars-cov-2-en.html>

Version: 2/2021 / Stand: 2021-01 Änderungen zu Version 1/2020 sind gelb markiert.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	3
2. PRODUKT BESCHREIBUNG	3
3. TEST PRINZIP	3
4. MATERIAL	4
4.1 Inhalt des ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kits	4
4.2 Zusätzlich notwendige Reagenzien und Geräte	4
4.3 Validierte Cycler und Reaktionsgefäße	5
5. LAGERUNG UND STABILITÄT	5
6. TESTVERFAHREN	6
6.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	6
6.2 RNA-Isolierung	6
6.3 Vorbereitung der Reagenzien	6
6.4 Amplifikation	6
6.5 Interpretation der Ergebnisse	8
7. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE	11
7.1 Nachweisgrenze	11
7.2 Klinische Evaluation der diagnostischen Sensitivität und Spezifität	12
7.3 Kreuzreaktivität	13
8. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	14
9. GRENZEN DER METHODE	15
10. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	15
11. TROUBLESHOOTING	16
12. IN DIESEM DOKUMENT/PRODUKT VERWENDETE MARKEN	16
13. ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE	17
14. LITERATUR	18

1. ZWECKBESTIMMUNG

Das ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kit wird für den qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B und RSV (Respiratorisches Synzytial Virus) RNA in Probenmaterial aus Atemwegen wie Sputum (LRT) und Nasopharyngeal- (NP), Oropharyngeal- (OP), Nasal-, Anterior Nasal- und mittlerer Nasenmuschel- Abstrich (UTR) 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 SARS-FluA/B-RSV-Kit wird zum *in vitro* Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B und RSV (Respiratorisches Synzytial Virus) RNA in Probenmaterial aus Atemwegen wie Sputum (LRT) und Nasopharyngeal- (NP), Oropharyngeal- (OP), Nasal-, Anterior Nasal- und mittlerer Nasenmuschel- Abstrich (UTR) verwendet. Das Kit basiert auf einer Ein-Schritt-Reaktion in der Real-Time PCR-Technologie. Mit einer effizienten cDNA-Synthese aus RNA in Verbindung mit einer Real-Time PCR bietet das ViroQ SARS-FluA/B-RSV 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, Influenza A, Influenza B und RSV. 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 entwickelt. Für SARS-CoV-2 werden die Gene RdRP (RNA-dependent RNA-Polymerase) und N (Nucleocapsid) amplifiziert (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);). Für Influenza A wird das Matrix-Segment (M1, Segment 7), für Influenza B wird das Nichtstrukturprotein-Segment (NS1) und für RSV wird das N Gen (Nucleocapsid) amplifiziert. Die verschiedenen Amplikons werden mit ebenfalls 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-Cyclers gemessen.

Der Test wird in einer einzelnen PCR-Reaktion durchgeführt, die die viralen Gene RdRP und N von SARS-CoV-2, das Matrix-Segment (M1) von Influenza A, das Nichtstrukturprotein-Segment (NS1) von Influenza B, das N Gen von RSV 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 SARS-FluA/B-RSV 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 | FSR** **ViroQ Mix FSR**, gebrauchsfertig, enthält Primer, Sonden, Lagerungspuffer
- **ViroQ | CFX | IC | MIX** **ViroQ CFX IC-Mix**, enthält Sonde der internen Kontrolle mit speziellem Fluorophor, geeignet für den CFX Cycler
- **ViroQ | LC | IC | MIX** **ViroQ LC IC-Mix**, enthält Sonde der internen Kontrolle mit speziellem Fluorophor, geeignet für den LightCycler®
- **ViroQ | QS | IC | MIX** **ViroQ QS IC-Mix**, enthält Sonde der internen Kontrolle mit speziellem Fluorophor, geeignet für den QuantStudio® 6 Cycler
- **FSR | CONTROL | +** **ViroQ Pos Ctrl FSR**, positive Kontrolle, getrocknet, enthält humane mRNA, virale Referenz RNA
- **IFU OR eIFU** **Gebrauchsinformation oder elektronische Gebrauchsinformation**

4.2 Zusätzlich notwendige Reagenzien und Geräte

- Reagenzien zur RNA Isolation (validierte RNA Isolationskits siehe 6.2)
- Real-Time PCR Cycler (validierte Cycler siehe 4.3)
- Real-Time PCR Reaktionsgefäße mit Deckeln oder Folien (validierte Produkte siehe 4.3)
- RNA/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	real-time-PCR reaction tubes	real-time-PCR closing system
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Fa. Bio-Rad	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® Break-A-Way PCR Plate, Low Profile, 96 white wells, black frame Product No. 4ti-1201 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
	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
QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop 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 ohne Kühlung 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 Probennahme 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:

- QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini QIAcube Kit
- QIAGEN EZ1 Virus Mini Kit V2.0
- Thermo Fisher Thermo KingFisher MagMAX Viral/PathogenNucleic Acid Isolation 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 FSR

Die Positivkontrolle ViroQ Pos Ctrl FSR ist getrocknet und muss mit 30 µl RNA/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 FSR (Primer und Sonden)
2 µl	ViroQ IC-Mix* (Sonde) / CFX oder LC oder QS
5 µl**	RNA-Probe
7 µl	RNA/RNase freies H ₂ O

* CFX96 Touch™ Real-Time PCR-Detektionssystem:	ViroQ CFX IC-Mix
LightCycler® 480 System II:	ViroQ LC IC-Mix
QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop:	ViroQ QS IC-Mix

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

Wichtiger Hinweis: Die interne Amplifikationskontrolle wird in Abhängigkeit vom verwendeten Real-Time PCR-Cycler in verschiedenen Fluoreszenzkanälen nachgewiesen. Daher sollte der geeignete ViroQ IC-Mix verwendet werden, da dieser die Sonde für die interne Amplifikationskontrolle enthält, die mit verschiedenen Fluorophoren markiert ist. Bitte prüfen Sie welche Filter Ihr Real-Time PCR-Cycler hat. Die Wellenlängen sind in einer Tabell in Kapitel [6.5 Interpretation der Ergebnisse](#) gezeigt.

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

Wenn ein Prämix aus ViroQ Enzyme, ViroQ Mix FSR, ViroQ CFX/LC/QS IC-Mix und RNA/RNase freiem 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 FSR verwendet. Für das Ansetzen einer **No Template Control (NTC)** wird RNA/RNase freies H₂O 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:

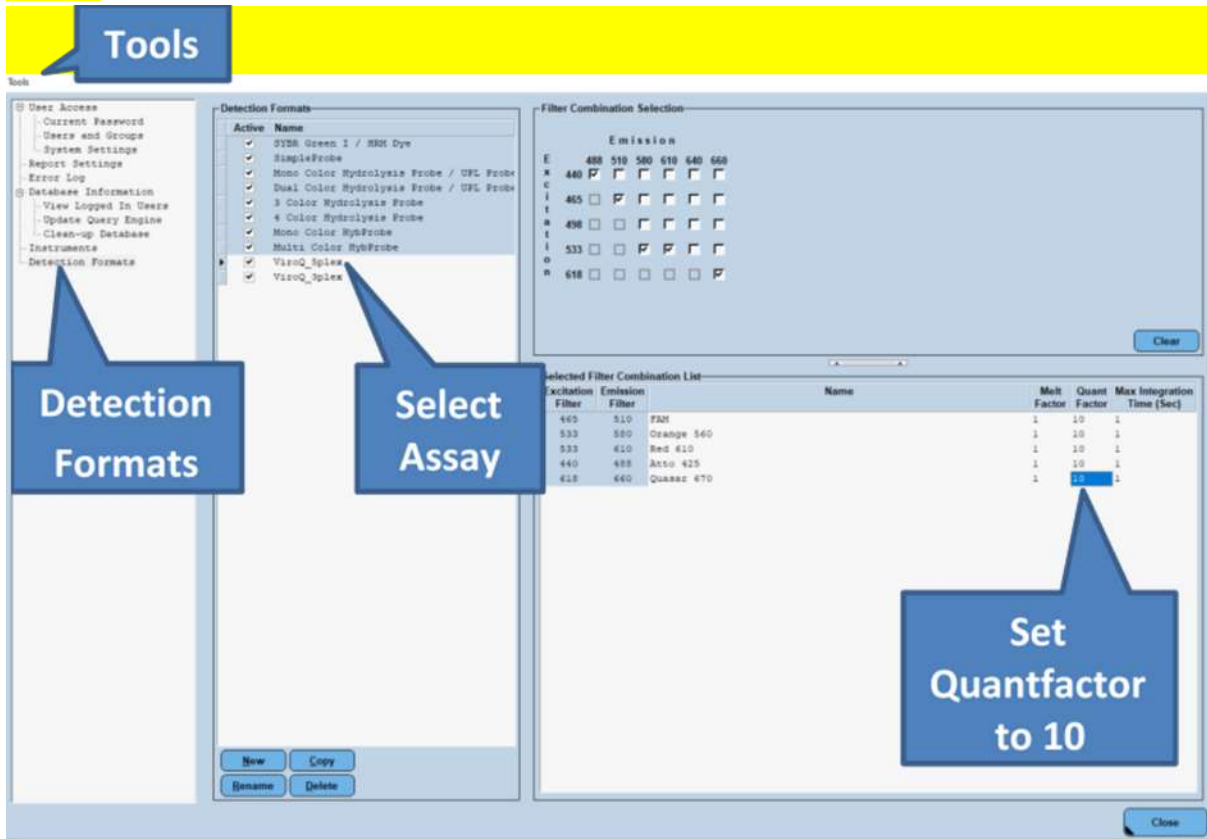
Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	15 min	48°C	1 Zyklus
Polymerase Aktivierung	3 min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	3 sec	95°C	42 Zyklen
Annealing + Extension	15 sec + reading	60°C	

Die folgenden Real-Time Cycler wurden für das ViroQ SARS-FluA/B-RSV-Kit validiert:

Biorad:	CFX96 Touch™ Real-Time PCR-Detektionssystem
Roche:	LightCycler® 480 System II (siehe Besondere Hinweise unten)
Applied Biosysteme:	QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop

Besondere Hinweise

- Wenn andere Real-Time Cycler verwendet werden, müssen diese vom Benutzer validiert werden.
 - Bei Benutzung des Light Cycler II 480 müssen erweiterte Einstellungen vorgenommen werden.
- Tools aufrufen → Detection Formats auswählen → Assay auswählen → Quantfactor auf 10 setzen



6.5 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 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 Kanal mit der internen Kontrolle zeigen. SARS-CoV-2 positive Proben müssen ein positives Signal im FAM Kanal (RdRP Gen & N Gen) zeigen. Influenza positive Proben müssen ein positives Signal entweder in einem der Kanäle CFO560 / HEX / VIC / JOE oder in einem der Kanäle Q670 / CY5 zeigen (M1 oder NS1). RSV positive Proben müssen ein positives Signal in einem der Kanäle CFR610 / Texas Red / ROX zeigen (N Gen). Die Positivkontrolle muss in jedem Kanal ein Amplifikationssignal innerhalb der definierten Ct-Werte aufweisen.

Kanal	Spezifität der Primer/Sondenmixe
FAM	SARS-CoV-2 / RdRP Gen (RNA-dependend RNA-Polymerase) & N Gen (Nucleocapsid)
CFO560 / HEX / VIC / JOE	Influenza A (H1N1pdm09 & H3N2) / Matrix-Segment (M1)
Q670 / CY5	Influenza B (Yamagata & Victoria) / Nonstructural protein-Segment (NS1)
CFR610 / Texas Red / ROX	RSV / N Gen (Nucleocapsid)
Atto425 / Q705 / TAMRA	Zellkontrolle / Rnase P

Die Amplifikations-signale für die verschiedenen Spezifitäten für negative Proben sollten außerhalb der definierten Ct-Werte für die jeweiligen Kanäle 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. Amplifikations-signale 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 bei **klinischen Proben** werden alle Ct-Werte ≤ 35 als positiv bewertet (siehe Tabelle unten).

	Kanal	Ct-Level	Prüfen	Wellenlänge in nm
RSV	Rot (CFR610)	≤ 35	>35-42	Anregung: 690 Emission: 705
SARS-CoV-2	Grün (FAM)	≤ 35	>35-42	Anregung: 495 Emission: 520
Influenza A	Orange (CFO560)	≤ 35	>35-42	Anregung: 538 Emission: 559
Influenza B	Rot (Q670)	≤ 35	>35-42	Anregung: 647 Emission: 670
Zellkontrolle mit ViroQ CFX IC-Mix	Rot (Q705)	$\leq 35^*$	>35-42**	Anregung: 590 Emission: 610
Zellkontrolle mit ViroQ LC IC-Mix	Blau (Atto425)	$\leq 35^*$	>35-42**	Anregung: 437 Emission: 483
Zellkontrolle mit ViroQ QS IC-Mix	Rot (TAMRA)	$\leq 35^*$	>35-42**	Anregung: 557 Emission: 591

* Eine hohe Konzentration der nachweisbaren Virus-RNA 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 werden 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 Positivkontrolle **ViroQ Pos Ctrl FSR** muss für alle vier im Kit detektierten Viren positiv sein. Die erwarteten Ct Werte für die Positivkontrolle sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Spezifität	Kanal	Ct Bereich
RSV	Rot (CFR610)	28-36
SARS-CoV-2	Grün (FAM)	25-33
Influenza A	Orange (CFO560)	28-35
Influenza B	Rot (Q670)	28-35
Zellkontrolle	Rot (Q705) / Blau (Atto425) / Rot (TAMRA)	28-35

Die folgende Tabelle zeigt die Interpretation der Amplifikationsergebnisse bis hin zu einer Koinfektion. Weitere Koinfektionen sind möglich, aber mit einer sehr geringen Auftretswahrscheinlichkeit und deswegen nicht in der Tabelle mit angegeben:

FAM SARS-CoV-2	CFO560 Influenza A	Q670 Influenza B	CFR610 RSV	Atto425 / Q705 /TAMRA Zellkontrolle	Ergebnis
+	-	-	-	+*	SARS-CoV-2 spezifische RNA nachgewiesen.
-	+	-	-	+*	Influenza A spezifische RNA nachgewiesen.
-	-	+	-	+*	Influenza B spezifische RNA nachgewiesen.
-	-	-	+	+*	RSV spezifische RNA nachgewiesen.
+	+	-	-	+*	SARS-CoV-2 und Influenza A spezifische RNA nachgewiesen.
+	-	+	-	+*	SARS-CoV-2 und Influenza B spezifische RNA nachgewiesen.
+	-	-	+	+*	SARS-CoV-2 und RSV spezifische RNA nachgewiesen.
-	+	+	-	+*	Influenza A und Influenza B spezifische RNA nachgewiesen.
-	+	-	+	+*	Influenza A und RSV spezifische RNA nachgewiesen.
-	-	+	+	+*	Influenza B und RSV spezifische RNA nachgewiesen.
-	-	-	-	+	Keine SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B oder RSV 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 Konzentration der nachweisbaren Virus-RNA 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, Influenza A, Influenza B oder RSV 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-, Influenza A-, Influenza B- oder RSV-RNA-Konzentration, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% oder höher erfolgreich nachgewiesen wird, definiert die Nachweisgrenze (LoD). Die LoD wurde anhand von fünf verschiedenen Verdünnungstufen einer Virus-

Referenz RNA bestimmt, die jeweils in 20 Wiederholungen getestet wurden. Die analytische Sensitivität des ViroQ-SARS-FluA/B-RSV RT-PCR Tests beträgt **5-7 Kopien / 20 µl Reaktion** mit dem LightCycler® 480 II System.

SARS-CoV-2: **5 Kopien / 20 µl Reaktion**
 Influenza A: **6 Kopien / 20 µl Reaktion**
 Influenza B: **7 Kopien / 20 µl Reaktion**
 RSV: **7 Kopien / 20 µl Reaktion**

7.2 Klinische Evaluation der diagnostischen Sensitivität und Spezifität

Für das ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kit wurde eine Leistungsbewertungsstudie mit 165 vortypisierten RNA-Proben durchgeführt. Es wurden Tests mit 91 SARS-CoV-2 vortypisierten RNA-Proben und 74 Influenza A, Influenza B und RSV vortypisierten RNA-Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie wurden mit den Ergebnissen verglichen, die von einem klinischen Labor in Routinetests mit Testkits eines anderen Herstellers erhalten wurden. Diskrepante Ergebnisse wurden unter Verwendung eines dritten Tests und mehrerer Wiederholungstests aufgeklärt. Die endgültige Bewertung der Ergebnisse für eine Probe wurde zur Berechnung der diagnostischen Spezifität und Sensitivität des Tests verwendet.

Ergebnisse für SARS-CoV-2:

Es wurden 91 RNA-Proben auf SARS-CoV-2 getestet.

		Referenz	
		Positiv	Negativ
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Positiv	39	0
	Negativ	0	52

Diagnostische Spezifität: 100%
 Diagnostische Sensitivität: 100%

Ergebnisse für Influenza A:

Es wurden 74 RNA-Proben auf Influenza A getestet. 2 Proben waren invalide und wurden aus der Evaluation ausgeschlossen. Eine Probe wurde wegen eines Übertragungsfehler ausgeschlossen.

		Referenz	
		Positiv	Negativ
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Positiv	30	0
	Negativ	1*	40

Diagnostische Spezifität: 100%
 Diagnostische Sensitivität: 96,8%

* 1 Probe wurde falsch negativ getestet. Testungen mit anderen Kits ergaben schwache Reaktionen mit Ct Werten über 38 für diese Probe.

Ergebnisse für Influenza B:

Es wurden 74 RNA-Proben auf Influenza B getestet. 2 Proben waren invalide und wurden aus der Evaluation ausgeschlossen. Eine Probe wurde wegen eines Übertragungsfehler ausgeschlossen.

		Referenz	
		Positiv	Negativ
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Positiv	10	0
	Negativ	0	61

Diagnostische Spezifität: 100%
 Diagnostische Sensitivität: 100%

Ergebnisse für RSV:

Es wurden 74 RNA-Proben auf RSV getestet. 2 Proben waren invalide und wurden aus der Evaluation ausgeschlossen. Eine Probe wurde wegen eines Übertragungsfehler ausgeschlossen.

		Referenz	
		Positiv	Negativ
ViroQ SARS-FluA/B-RSV	Positiv	26	0
	Negativ	0	45

Diagnostische Spezifität: 100%
Diagnostische Sensitivität: 100%

7.3 Kreuzreaktivität

Eine *in silico* Betrachtung ergab für die nachgewiesenen Gene der verschiedenen Viren im ViroQ SARS-FluA/B-RSV Kit, dass keine Kreuzreaktivität der Zielregionen mit anderen Viren besteht.

Um die analytische Spezifität und Exklusivität des ViroQ SARS-FluA/B-RSV 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-FluA/B-RSV Kit getestet.

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)					✓

Ergebnisse der Testungen mit dem Kontrollpanel	
Fluoreszenzkanal spezifisch für	Fluoreszenzsignale mit RNA, isoliert aus dem Kontrollpanel, in den jeweiligen Kanälen
SARS-CoV-2 RNA	Keine Fluoreszenzsignale mit RNA aus allen Pools
Influenza A RNA	Nur Fluoreszenzsignale mit RNA aus Pools, die Influenza A enthalten. Keine Fluoreszenzsignale mit RNA aus den anderen Pools.
Influenza B RNA	Nur Fluoreszenzsignale mit RNA aus Pools, die Influenza B enthalten. Keine Fluoreszenzsignale mit RNA aus den anderen Pools.
RSV RNA	Nur Fluoreszenzsignale mit RNA aus Pools, die RSV enthalten. Keine Fluoreszenzsignale mit RNA aus den anderen Pools.

8. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Das ViroQ SARS-FluA/B-RSV 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 Gefahrstoffkennzeichnung 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 RNA/Rnase freiem H₂O bei jedem Assay werden dringend empfohlen.

In der Negativkontrolle mit RNA/Rnase freiem H₂O darf kein Fluoreszenzsignal vorhanden sein (Ct > 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, Influenza A, Influenza B oder RSV 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 SARS-FluA/B-RSV Kits kann unter Verwendung einer Kombination von RNA-Proben durchgeführt werden, von denen bekannt ist, dass sie positiv oder negativ sind für die verschiedenen Spezifitäten. Negativkontrollen zur Erkennung möglicher Kontaminationen werden empfohlen. Verwenden Sie zu diesem Zweck eine PCR-Reaktion mit RNA/Rnase freiem H₂O 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.

Quasar[®] ist ein registrierter Markenname der Firma LGC Biosearch Technologies.

13. ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE

ERKLÄRUNG DER AUF DEN ETIKETTEN VERWENDETEN SYMBOLE	
	Ausreichend für n Tests
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Hersteller
DRY	Getrocknet
CONT	Inhalt, enthält
FSR CONTROL +	Positive Kontrolle für ViroQ SARS-FluA/B-RSV
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 FSR	Primermix für ViroQ SARS-FluA/B-RSV
ViroQ CFX IC MIX	Zusätzlicher Sondenmix für ViroQ SARS-FluA/B-RSV, wenn folgender Real-time PCR-Cycler benutzt wird: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
ViroQ LC IC MIX	Zusätzlicher Sondenmix für ViroQ SARS-FluA/B-RSV, wenn folgender Real-time PCR-Cycler benutzt wird: LightCycler® 480 System II
ViroQ QS IC MIX	Zusätzlicher Sondenmix für ViroQ SARS-FluA/B-RSV, wenn folgender Real-time PCR-Cycler benutzt wird: QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR-System 96-Well Fast, laptop
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

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

Peter M. Howley, David M. Knipe; Fields Virology Emerging Viruses; Ausgabe 7; Wolters Kluwer Health, 2020; ISBN 1975112555, 9781975112554

Phoebe Lostroh; Molecular and Cellular Biology of Viruses; Ausgabe 1; CRC Press Inc, 2019; ISBN 978-0-8153-4523-7

van Elden LJ, van Loon AM, van der Beek A, Hendriksen KA, Hoepelman AI, van Kraaij MG, Schipper P, Nijhuis M.; Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults.; J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4378-81. doi: 10.1128/jcm.41.9.4378-4381.2003. Erratum in: J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4308. PMID: 12958272; PMCID: PMC193825.

Peaper DR, Landry ML.; Rapid diagnosis of influenza: state of the art.; Clin Lab Med. 2014 Jun;34(2):365-85. doi: 10.1016/j.cll.2014.02.009. PMID: 24856533; PMCID: PMC7172071.

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

Gebrauchsinformationen 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