

ViroReal[®] Kit SARS-CoV-2 Multiplex

Gebrauchsanweisung



CE

IVD

In-vitro-Diagnostikum

REF

DHUV02413

Σ

100

REF

DHUV02413x5

Σ

500



ingenetix GmbH
 Arsenalstraße 11
 1030 Vienna, Austria
 T +43 (0)1 36 198 0 198
 F +43 (0)1 36 198 0 199
 office@ingenetix.com
 www.ingenetix.com

Index

1. Verwendungszweck.....	3
2. Produktbeschreibung.....	3
3. Erregerinformation.....	4
4. Inhalt, Stabilität und Lagerung.....	4
5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise.....	5
7. Grenzen des Verfahrens.....	6
8. Vorbereitung der Proben und real-time PCR.....	7
8.1. Interne RNA Kontrolle (RNA IPC).....	7
8.2. Positivkontrolle.....	7
8.2. Pipettierschema.....	7
8.3. Programmierung des Temperaturprofils.....	8
9. Interpretation der PCR-Daten.....	9
10. Troubleshooting.....	10
10.1. Kein Signal im FAM und/oder VIC Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe.....	10
10.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle.....	10
10.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion.....	10
10.4. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle.....	11
10.5. Kein Signal im FAM und/oder VIC Kanal und Cy5 Kanal mit Probe.....	11
11. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance.....	12
11.1. Testperformance.....	12
11.2. Nachweisgrenze und Linearität.....	13
11.2.1. LoD.....	13
11.2.2. Linearität.....	14
11.3. Inter-Assay-Präzision.....	14
11.4. Intra-Assay-Präzision.....	15
11.5. Analytische Spezifität.....	15
11.6. Diagnostische Evaluierung.....	15
12. Literatur.....	16
13. Änderungsindex.....	16

Erklärung der Symbole

	Chargen-Bezeichnung		Verwendbar bis
	Bestell-Nummer		Hersteller
	Ausreichend für "n" Ansätze		Aufbewahrung bei
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für <i>in-vitro</i> Diagnostika		<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Ätzwirkung, GHS05		Ausrufezeichen, GHS07

1. Verwendungszweck

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex ist ein *in-vitro* Diagnostik Test zum Nachweis von RNA für das N Gen von SARS-CoV-2, SARS-CoV und SARS-ähnlichen CoV (universeller Nachweis von Sarbecoviren) sowie des RdRp Gens von SARS-CoV-2 (spezifischer Nachweis von SARS-CoV-2) mittels one-step reverse Transkription real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in Proben aus dem unteren und oberen Respirationstrakt von Patienten mit und ohne Verdacht auf eine COVID-19 Erkrankung oder einer Infektion mit einem SARS Coronavirus.

Geeignete Untersuchungsmaterialien für den unteren Respirationstrakt sind Sputa, BAL und Trachealsekrete.

Geeignete Untersuchungsmaterialien für den oberen Respirationstrakt sind Nasopharynx-/Oropharynxabstriche, Abstriche aus der vorderen und mittleren Nasenmuschel, Rachenspülungen, Nasopharynx- Spülungen oder Aspirate und Nasenaspirate.

Abstriche aus der vorderen und mittleren Nasenmuschel und Nasenaspirate sind nur für Patienten mit Verdacht auf eine COVID-19 Erkrankung geeignet.

2. Produktbeschreibung

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex erkennt das Nukleokapsid Protein Gen (N Gen) von SARS-CoV-2, SARS-CoV und SARS-ähnlichen CoV (Sarbecoviren) sowie das RdRp Gen von SARS-CoV-2.

Der Multiplex-Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-Coronavirus-Stämme (Sarbecovirus) einschließlich SARS-CoV-2 sowie die Unterscheidung zwischen SARS-CoV-2 und den anderen Sarbecovirus-Stämmen.

Das gewählte Design für den Nachweis des N Gens inkludiert eine hochkonservierte Region in allen SARS-Coronavirus-Clustern des N Gens und ermöglicht den universellen Nachweis von bisher bekannten Sarbecoviren einschließlich SARS-CoV-2. Der universelle Testcharakter berücksichtigt mögliche zukünftige Mutationen der SARS-CoV-2 Virussequenz. Durch dieses Design hat der Test das Potential, auch neu auftretende SARS Coronaviren zu detektieren. Das N Gen wird im Fluoreszenzkanal für FAM (530 nm) detektiert.

Für das RdRp Gen wurde ein für SARS-CoV-2 hochspezifischer Sequenzbereich gewählt, was den spezifischen Nachweis von SARS-CoV-2 ermöglicht. Das RdRp Gen wird im Fluoreszenzkanal für VIC (554 nm) detektiert.

Die interne RNA Positivkontrolle (RNA IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert und dient als Kontrolle der RNA Extraktion und der RT-PCR Inhibitionskontrolle. Das Target für die RNA IPC wird während der Probenextraktion zugegeben.

Dieser Test eignet sich für real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren können (z.B. ABI® 7500 instrument (Thermo Fisher Scientific), QuantStudio 5, QuantStudio 7 (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent), qTOWER³G (Analytik Jena), MIC instrument (bio molecular systems), LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics), cobas z 480 Analyzer (Roche)).

Bei Verwendung von PCR-Plattformen, die nicht von ingenetix getestet wurden, wird eine Evaluierung der Multiplex-PCR empfohlen. Beachten Sie, dass einige PCR-Plattformen zuerst mit dem entsprechenden Farbstoff kalibriert werden müssen, bevor eine Multiplex-PCR durchgeführt werden kann.

Dieser Test basiert auf der one-step reverse Transkription real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Dazu wird im ersten Schritt ein spezifischer RNA-Bereich aus dem Erregergenom in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Das generierte PCR-Produkt wird mit Hilfe einer fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-Sonde detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal®, PanReal®, ParoReal® und SeptiReal® Kits verwenden die gleichen Temperaturprofile. RNA und DNA können in einem PCR Lauf analysiert werden.

3. Erregerinformation

Coronaviren sind positive einzelsträngige RNA Viren der Familie *Coronaviridae*. Derzeit bekannt ist, dass verschiedene Coronavirusstämme Menschen infizieren (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, NCoV und HCoV-EMC). Die Stämme HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, MERS-CoV und HCoV-HKU1 verursachen beim Menschen Erkältungen, Infektionen der oberen Atemwege, Bronchiolitis und Lungenentzündungen. SARS-CoV, ein Beta-Coronavirus, verursacht das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS).

SARS-CoV-2 ist ein Beta-Coronavirus, das im Dezember 2019 in Wuhan, China, aufgetreten ist. Das Virus verursacht die Erkrankung COVID-19 (corona virus disease 2019). Fieber, Husten und Atembeschwerden werden als die häufigsten Anfangssymptome beschrieben, eine Infektion kann in weiterer Folge zu einer Lungenentzündung führen. Das Coronavirus wird hauptsächlich durch Tröpfchen oder Kontakt übertragen.

4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	DHUV02413	DHUV02413x5	Lagerung
		Menge 100 Reaktionen	Menge 500 Reaktionen	
SARS-CoV-2 Multiplex Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde für Virus Detektion (FAM, VIC) und für RNA IPC (Cy5) Detektion	1 x 100 µl	1 x 500 µl	-15°C bis -25°C
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC	1 x 100 µl	1 x 500 µl	-15°C bis -25°C
SARS-CoV-2 Multiplex Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle für N Gen und RdRp Gen (à 10 ³ Kopien/µl)	1 x 120 µl	1 x 300 µl	-15°C bis -25°C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktionsmix	1 x 500 µl	5 x 500 µl	-15°C bis -25°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	3 x 1000 µl	-15°C bis -25°C

Die Komponenten des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholte Einfrier- / Auftauzyklen sollten vermieden werden. Schützen Sie die Kit-Komponenten vor Licht.

RNA Reaction Mix: Der im Kit enthaltene Master-Mix wurde für eine zuverlässige, hochempfindliche Real-Time-PCR mit reverser, one-step Transkription entwickelt, auch bei Vorhandensein gängiger Reaktionsinhibitoren. Der Master Mix enthält eine thermostabile MMLV-Reverse-Transkriptase, einen RNase-Inhibitor, eine hochgereinigte Taq-Polymerase für schnelle hot-start-PCR, dNTPs, ROX™ -Farbstoff (passive Referenz) und Pufferkomponenten - Additive, die für den Umgang mit RT-PCR-Inhibitoren optimiert sind.

5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für RNA-Extraktion
- Nuklease-freies Wasser für Verdünnung des RNA IPC Targets und der Positivkontrolle
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten
- Pipettenspitzen mit Filter
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM, VIC und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße und geeignetes optisches Verschlussmaterial

6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

- *In vitro*-Diagnostikum: Dieses Produkt sollte nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Das real-time PCR Gerät sollte regelmäßig gewartet und gereinigt werden.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen ist erforderlich.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie Laborhandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation zu verwenden. Die Geräte und Materialien müssen diesen Arbeitsbereichen zugeordnet sein. Der Arbeitsablauf muss von Prä- zu Post-PCR im Labor verlaufen.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der Verwendung der Proben und der Positivkontrolle sollten die Handschuhe gewechselt werden.
- Die Lagerung von positivem und potentiell positivem Material sollte separat von allen anderen Reagenzien erfolgen.
- Die Qualität der RNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete RNA Extraktionssystem mit RT-PCR Technologie kompatibel ist.
- Kontaminationen von Geräten und Materialien mit DNA/RNA, Nukleasen oder Amplifikationsprodukten sind durch gute Laborpraxis zu vermeiden.
- Komponenten sollten vor Licht geschützt werden und wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse muss eine Negativkontrolle während der RNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen und in jedem PCR-Lauf analysiert werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Virus RNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- In jedem PCR-Lauf sollte zusätzlich optional eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe) mitgeführt werden.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen, entsorgt werden.
- Bitte beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.
- **Vorsicht:** Das RNA IPC Target wird in RNA-Stabilizer aufbewahrt, welcher Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält (siehe MSDS, www.ingenetix.com).

7. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Aufarbeitung der Proben gewährleistet.
- Mit diesem Kit wurde die Detektion von SARS-CoV-2 RNA (siehe Punkt 11.4) aus Proben aus dem Respirationstrakt validiert. Die Testperformance mit anderen klinischen Probentypen wurde bislang noch nicht bewertet.
- Das Testen von Abstrichen aus der vorderen und mittleren Nasenmuschel ist nur für Patienten mit Symptomen einer COVID-19 Erkrankung geeignet.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer SARS-CoV-2 oder SARS-CoV Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden können. PCR Inhibitoren können zu einem ungültigen Ergebnis führen.
- Generell können eventuell vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Target-Region von bislang nicht bekannten klinischen Subtypen können zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen. Der universelle Testcharakter von ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex berücksichtigt mögliche zukünftige Mutationen der SARS-CoV-2 Virussequenz und verringert somit die Wahrscheinlichkeit von falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen aufgrund von Mutationen in der Target-Region.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

8. Vorbereitung der Proben und real-time PCR

Proben dürfen nicht eingefroren werden – eine Lagerung bei 4°C wird empfohlen. Die Proben sollten noch am selben Tag untersucht werden. Abstriche werden entweder trocken oder in 0,9% NaCl gelagert. Geeignete Tupfer: Polyester oder Rayon Tupfer mit Plastik oder Aluminium Applikator.

Extrahieren Sie RNA aus 140-200 µl Probe (je nach Extraktionsmethode) und eluieren Sie in 50 µl.

Extrahieren Sie die Probe mit einem RNA Extraktionssystem, das mit RT-PCR Technologie kompatibel ist. Es muss immer eine Negativkontrolle der RNA-Extraktion mitgeführt werden (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial).

- Pro PCR-Lauf müssen eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der RNA-Extraktion und optional eine Negativkontrolle der PCR (Wasser) mitgeführt werden. RNA Proben auf Eis auftauen.
- RNA Reaktionsmix auf Eis auftauen und 2- bis 3-mal durch Invertieren des Röhrchens mischen, um eine homogene Lösung zu erhalten. Der RNA Reaktionsmix sollte nicht auf Raumtemperatur erwärmt werden. Alle weiteren Kitkomponenten müssen vor dem Ansetzen des Master Mixes vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Den Master Mix für die RT-PCR auf Eis ansetzen.
- Die RNA unmittelbar nach der Extraktion verwenden (immer auf Eis lagern) und so bald als möglich bei -20°C bis -80°C lagern. Die extrahierte RNA ist bei sachgerechter Lagerung bei -80°C ca. 3-6 Monate stabil, bei -20°C ca. 3-6 Wochen, bei 4°C ca. 3-5 Stunden und bei Raumtemperatur ca. 30-60 Sekunden.

8.1. Interne RNA Kontrolle (RNA IPC)

Die RNA IPC dient der Kontrolle der Extraktion, identifiziert mögliche PCR Inhibierungen und überprüft die Integrität der Kit Reagenzien.

Das RNA IPC Target (ca. 6×10^5 Kopien/µl) wird in RNA-Stabilizer aufbewahrt, welcher Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält. Dieser Stabilizer kristallisiert durch mehrmalige Einfrier- / Auftauzyklen und kann durch kurzes Anwärmen auf ca. 50°C wieder gelöst werden.

→ **Als Kontrolle der Extraktion und RT real-time PCR:** Das RNA IPC Target wird während der Extraktion zugesetzt. Pipettieren Sie pro Probe 1 µl unverdünntes RNA IPC Target zum Lysepuffer und setzen Sie dann die Extraktion fort.

Achtung: Das unverdünnte RNA IPC Target darf nicht direkt zum Probenmaterial pipettiert werden, sondern muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

→ **Als Alternative**, falls das RNA IPC Target ausschließlich **zur Kontrolle der RT real-time PCR** eingesetzt werden soll (nicht empfohlen): Pipettieren Sie 1 µl des frisch 1:500 verdünnten RNA IPC Targets (ca. 1200 Kopien) pro Reaktion direkt zum Mastermix.

Achtung: Das RNA-IPC-Target darf dem Mastermix nicht unverdünnt zugesetzt werden.

8.2. Positivkontrolle

SARS-CoV-2 Multiplex Positivkontrolle ist eine Mischung von zwei *in vitro* synthetisierten RNA Fragmenten mit einer Konzentration von jeweils 10^3 Kopien/µl und muss bei -20° C gelagert werden. Positivkontrolle vor Gebrauch vorsichtig mischen, nicht vortexen. Um wiederholte Einfrier- / Auftauzyklen zu vermeiden, kann die Positivkontrolle bei mehrmaliger Benutzung am selben Tag bei 4°C zwischengelagert werden. Verwenden Sie als Positivkontrolle 10 µl SARS-CoV-2 Multiplex Positive Control (roter Verschluss). Die Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

8.2. Pipettierschema

		Pro Probe
Ansetzen Master Mix (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	4.0 µl
	RNA Reaction Mix	5.0 µl
	SARS-CoV-2 & SARS Multiplex Assay Mix	1.0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix	10.0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	10.0 µl
	RNA-Probe*	10.0 µl
	Gesamtvolumen	20.0 µl

*10 µl Probe kann verwendet werden. Bei Verwendung eines anderen Volumens als 10 µl muss das Volumen mit Nuklease-freiem Wasser entsprechend angepasst werden.

→ **Nicht empfohlen - falls das RNA IPC Target nicht während der Extraktion zugegeben wurde:** Verdünnen Sie das RNA IPC Target frisch 1:500 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. In diesem Fall dient das RNA IPC Target zur Kontrolle der RT real-time PCR.

Achtung: Bei Verwendung von mehr als 1 µl 1:500 verdünntem RNA IPC Target pro Reaktion wird die RT-PCR Reaktion inhibiert.

Pipettieren Sie pro Probe jeweils 10 µl des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte und geben Sie anschließend 10 µl der extrahierten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle immer zum Schluss. Platte anschließend mit geeignetem optischen Verschlussmaterial verschließen.

8.3. Programmierung des Temperaturprofils

Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers. Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

Probenvolumen: 20 µl

Temperaturprofil:

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None Reverse Transcription	Cycles: 1 Analysis: None Polymerase Activation	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60°C
50°C	95°C 20 sec	95°C 5 sec 60°C 30 sec
15 min		

Für ABI® 7500 Instrument:
Ramp speed: Without "fast cycling" parameter

Anmerkung: Diese Parameter gelten für alle ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal, PanReal, ParoReal und SeptiReal Kits.

Auswahl der Detektionskanäle:

FAM-TAMRA: Universelle Detektion von SARS-CoV-2 oder SARS-CoV (Sarbecovirus)

VIC-NONE: Spezifische Detektion von SARS-CoV-2

Cy5-NONE: Detektion von IPC

Referenzfarbstoff, falls nötig: ROX (z.B. für ABI® 7500 Instrument und Mx3005P®)

Für MIC Instrument (bio molecular systems):

FAM: Green

VIC: Yellow

Cy5: Red

Kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

Für cobas z 480 Analyzer (Roche):

FAM: Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

VIC: Anregung bei 540 nm, Emission bei 580 nm

Cy5: Anregung bei 610 nm, Emission bei 670 nm

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe, kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

Für LightCycler® 480 II (Roche):

FAM: Anregung bei 465, Emission bei 510 nm

VIC: Anregung bei 533, Emission bei 580 nm

Cy5: Anregung bei 618, Emission bei 670 nm

Die Color Compensation für FAM und VIC muss nach der Analyse von Cy5 aus der Roche Datenbank ausgewählt werden.

Detection format: 3 Color Hydrolysis Probe, kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

9. Interpretation der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM und VIC Kanal für das Virus Target und Cy5 Kanal für das RNA IPC Target. Proben mit positiven Cq-Werten werden positiv gewertet (Quantification cycle (Cq) = Cycle threshold (Ct) = Crossing point (Cp)).

Wichtig: Überprüfen Sie neben den Cq-Werten auch die Amplifikationskurven und passen Sie gegebenenfalls den Threshold an. Die Proben sollten sowohl in der logarithmischen als auch linearen Ansicht überprüft und mit der Negativkontrolle verglichen werden.

Tabelle 1 zeigt die Kriterien für valide Kontrollen. Tabelle 2 zeigt die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

Tabelle 1 Kriterien für valide Kontrollen, wenn das IPC Target während der Extraktion zugegeben wurde

	Cq FAM Kanal N Gen	Cq VIC Kanal RdRp Gen	Cq Cy5 Kanal RNA IPC ²	Interpretation	Vorgehensweise
Positivkontrolle	25-27	25-27	Negativ	Valid	-
Positivkontrolle	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
Positivkontrolle	25-27	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
Positivkontrolle	Negativ	25-27	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
Positivkontrolle	25-27	25-27	Positiv	Invalid	Siehe 10.4
Negativkontrolle der RNA-Extraktion	Negativ	Negativ	25-28	Valid	-
Negativkontrolle der RNA-Extraktion	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
Negativkontrolle der RNA-Extraktion	Positiv	Positiv	25-28	Invalid	Siehe 10.3
Negativkontrolle der RNA-Extraktion	Positiv	Negativ	25-28	Invalid	Siehe 10.3
Negativkontrolle der RNA-Extraktion	Negativ	Positiv	25-28	Invalid	Siehe 10.3
Negativkontrolle ¹	Negativ	Negativ	Negativ	Valid	-
Negativkontrolle ¹	Positiv	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 10.2
Negativkontrolle ¹	Negativ	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 10.2
Negativkontrolle ¹	Positiv	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.2
Negativkontrolle ¹	Negativ	Negativ	Positiv	Invalid	Siehe 10.4

¹ Optional

² Falls das RNA IPC Target direkt zum Mastermix zugegeben wurde, müssen alle Proben im Cy5 Kanal positiv sein

Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen untersucht und für valid und akzeptabel befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

Tabelle 2 Interpretation der klinischen Proben

	Cq FAM Kanal N Gen	Cq VIC Kanal RdRp Gen	Cq Cy5 Kanal RNA IPC Target	Interpretation	Vorgehensweise
Klinische Probe	Negativ	Negativ	25-28 ¹	Negativ	-
Klinische Probe	Positiv	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für SARS-CoV-2	-
Klinische Probe	Negativ	Positiv	Positiv/Negativ ²	Positiv für SARS-CoV-2	-
Klinische Probe	Positiv ³	Negativ ³	Positiv/Negativ ²	Positiv für Sarbecoviren ³	-
Klinische Probe	Negativ	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.5

¹ Das positive Signal der RNA IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibierung aus. Die IPC Cq-Werte sollten jedoch vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Cq-Werte kann auf eine partielle Inhibierung hindeuten.

² Eine hohe Viruskonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der RNA IPC führen.

³ Falls die Probe im FAM Kanal schwach positiv (ca. Cq > 33) und im VIC Kanal negativ ist, liegt eine geringe Viruskonzentration vor. In diesem Fall ist eine Unterscheidung zwischen SARS-CoV-2 oder einem anderen Sarbecovirus nicht möglich.

10. Troubleshooting

10.1. Kein Signal im FAM und/oder VIC Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Instrument.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
→ Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Schemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.
- Die RNA ist möglicherweise abgebaut.
- Die RNA IPC wurde direkt zum Mastermix gegeben, jedoch nicht frisch 1:500 verdünnt. Die PCR Reaktion ist dadurch inhibiert.
→ Stellen Sie eine frische 1:500 Verdünnung der RNA IPC her und wiederholen Sie die PCR.
- Es wurde keine Positivkontrolle zugegeben.
→ Falls alle klinischen Proben ebenfalls negativ sind, wiederholen Sie die PCR.
- Zur ausschließlichen Kontrolle der RT real-time PCR muss das RNA IPC Target 1:500 frisch verdünnt zum Mastermix zugegeben werden. Falls kein RNA IPC Target zum Mastermix pipettiert wurde:
→ Stellen Sie eine frische 1:500 Verdünnung der RNA IPC her und wiederholen Sie die PCR.
- Zur Kontrolle der RNA Extraktion und RT real-time PCR muss das unverdünnte IPC Target während der Extraktion zugegeben werden. Falls das RNA IPC Target vergessen wurde:
→ Wiederholen Sie die RNA Extraktion.

10.2. Erreger-Signal in der Negativkontrolle

- Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor.
→ Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
→ Pipettieren Sie die Positivkontrolle zuletzt.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

10.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion

- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
→ Wiederholen Sie die RNA-Extraktion und PCR unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.
→ Siehe auch 10.3.

10.4. IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle

- RNA IPC Target wurde während der Extraktion zugegeben, aber es gibt IPC spezifisches Signal mit der Negativkontrolle und der Positivkontrolle: Kontamination mit dem RNA IPC Target.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

10.5. Kein Signal im FAM und/oder VIC Kanal und Cy5 Kanal mit Probe

- Falsche Einstellung der Detektionskanäle mit der Probe
→ Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
 - Die RNA ist möglicherweise abgebaut.
 - Falls das RNA IPC Target während der Extraktion zugegeben wurde:
 - PCR Inhibierung liegt vor.
 - RNA Extraktion ist fehlgeschlagen.
 - Das RNA IPC Target wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.
 - Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.
- Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine geeignete RNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die Arbeitsschritte der RNA-Extraktion.

11. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

11.1. Testperformance

Abbildung 2 zeigt die Performance von ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

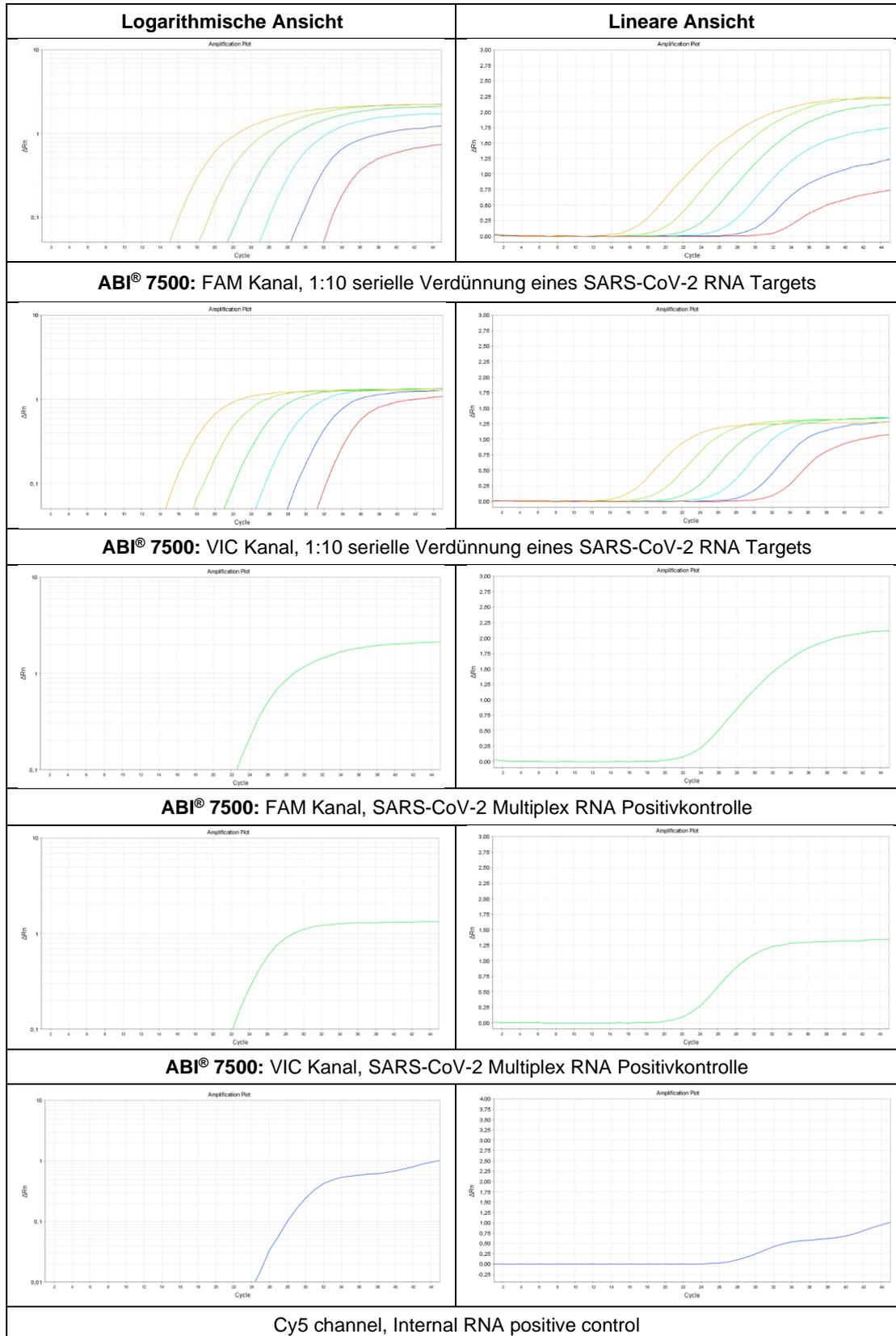


Abbildung 2. Performance des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex am ABI® 7500 Instrument

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex wurde mit Applied Biosystems® (ABI) 7500 instrument (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent), qTOWER³G (Analytik Jena), MIC instrument (bio molecular systems) und LightCycler® 480 I (Roche) validiert.

Um die Kompatibilität des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex mit verschiedenen real-time PCR Geräten zu testen, wurden SARS-CoV-2-negative Sputumextrakte (QIAamp Viral RNA Mini Kit) mit verschiedenen Konzentrationen AMPLIRUN® Coronavirus SARS-CoV-2 RNA-Control (Vircell, Bestell-Nr. MBC137-R) (100, 50, 25, 12,5, 6 und 3 Kopien/PCR-Reaktion) versetzt und getestet. Getestete Instrumente: ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent), MIC-Instrument (bio molecular systems) und qTOWER³G (Analytik Jena). Die Resultate zeigten vergleichbare Ergebnisse der analytische Sensitivität, unabhängig von den verwendeten Amplifikationsplattformen, siehe Tabelle 3 und 4.

Tabelle 3: Validierung unterschiedlicher real-time PCR Geräte - Detektion des N Gens

	Cq Wert			
	ABI® 7500	MIC	Mx3005P®	qTOWER ³ G
100 Kopien	29,64	29,90	30,73	35,14
50 Kopien	30,69	31,04	32,03	34,98
25 Kopien	31,79	31,78	32,36	35,26
12,5 Kopien	32,44	31,20	35,11	38,05
6 Kopien	34,97	33,77	35,43	37,44
3 Kopien	33,97	34,44	36,47	43,90

Tabelle 4: Validierung unterschiedlicher real-time PCR Geräte - Detektion des RdRp Gens

	Cq Wert			
	ABI® 7500	MIC	Mx3005P®	qTOWER ³ G
100 Kopien	30,26	32,35	32,54	33,14
50 Kopien	31,43	33,39	33,31	33,14
25 Kopien	31,92	33,72	34,45	33,54
12,5 Kopien	33,25	34,88	35,59	34,87
6 Kopien	34,17	35,45	36,31	34,58
3 Kopien	35,50	38,72	37,71	37,10

11.2. Nachweisgrenze und Linearität

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex wurde mit einer 10-fach Verdünnungsreihe einer synthetischen RNA, die Teile der SARS-CoV-2 Virus RNA repräsentiert, getestet. Es konnten mindestens drei Target Kopien/Reaktion nachgewiesen werden.

11.2.1. LoD

Zur Bestimmung der LoD wurde Sputum (1:1 mit Sputasol versetzt) extrahiert (QIAamp Viral RNA Mini Kit) und das Extrakt mit einer kommerziell erhältlichen SARS-CoV-2 RNA (AMPLIRUN® Coronavirus SARS-CoV-2 RNA-Control, Vircell, Bestell-Nr. MBC137-R) gespickt. Die LoD wurde mit Verdünnungen rund um die analytische Sensitivität in jeweils 20 Replikaten getestet und mittels einer non-linearen Kurvenanpassung mit der Graph Pad Prism Software ermittelt. Die Nachweisgrenze (LoD95: Anzahl an Kopien, welche in 95% der

Fälle positiv detektiert werden) beträgt 13 Kopien/Reaktion für das N Gen und 6 Kopien/Reaktion für das RdRp Gen.

11.2.2. Linearität

Die Linearität wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsreihe der synthetischen RNA ermittelt.

Für das N Gen zeigt der Test zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von -3,37 und einem Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,99$ (Abbildung 3).

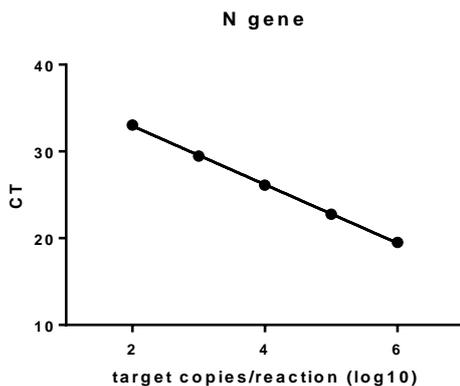


Abbildung 3 10-fache Verdünnungsreihe einer synthetischen SARS-CoV-2 RNA, FAM Kanal, N Gen

Für das RdRp Gen zeigt der Test zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von -3,54 und einem Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,96$ (Abbildung 4).

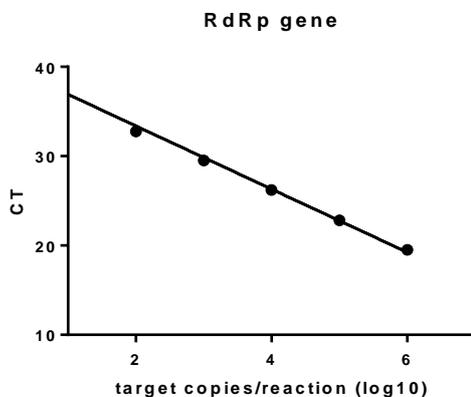


Abbildung 4 10-fache Verdünnungsreihe einer synthetischen SARS-CoV-2 RNA, VIC Kanal, RdRp Gen

11.3. Inter-Assay-Präzision

Die Inter-Assay-Präzision ist definiert als die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Probe zwischen PCR-Läufen. Die Inter-Assay-Präzision des ViroReal® Kits SARS-CoV-2 Multiplex wurde mit 10-fach Verdünnungen einer RNA (1,00E+06 bis 1,00E+00 Zielkopien/Reaktion) in drei unabhängigen Experimenten, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, in Quadruplikaten bestimmt.

Die Variationskoeffizienten lagen für das N Gen im Bereich 0,27% bis 3,80%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 1,04% und für das RdRp Gen im Bereich 0,05% bis 5,75%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 1,27%.

11.4. Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision ist definiert als die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Probe innerhalb eines PCR-Laufs. Die Intraassay-Präzision des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex wurde aus den Wiederholungsläufen von 11.3 bestimmt.

Die Variationskoeffizienten lagen für das N Gen im Bereich von 0,32% bis 3,20% mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 1,07% und für das RdRp Gen im Bereich von 0,08% bis 5,84% mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 1,55%.

11.5. Analytische Spezifität

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex weist das Nukleokapsid-Protein-Gen (N-Gen) von SARS-CoV-2, SARS-CoV und SARS-verwandten Coronaviren (Sarbecoviren) sowie das RdRp-Gen von SARS-CoV-2 nach. Andere Beta-Coronaviren werden mit diesem Kit nicht nachgewiesen. Die Spezifität wird durch die Auswahl hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. *In silico* Validierung der Primer und Sonden wurde mit dem basic local alignment tool (BLAST) in der NCBI Datenbank und mit Sequenzanalysen in der GISAID Datenbank durchgeführt. Es wurde auf potentielle Homologien zu aktuell veröffentlichten Sequenzen überprüft. Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet.

Für das N-Gen wurde eine hochkonservierte Region in allen SARS-Coronavirus-Clustern (SARS-CoV-2 sowie SARS-CoV und SARS-verwandtes Fledermaus-Coronavirus) als Zielregion gewählt. Die gewählten Primer und die Sonde sollen mögliche zukünftige Mutationen der Virussequenz abdecken und sind bis auf einen Primer nicht identisch mit den von der WHO publizierten Primern und Sonden. Alle Daten in der NCBI-Datenbank zeigten Homologie der Sequenzregion von Primern und Sonde in allen SARS-Coronavirus Clustern. Dieser Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-Coronavirusstämme einschließlich SARS-CoV-2.

Für das RdRp-Gen wurde eine hochspezifische Region für SARS-CoV-2 ausgewählt. Das Design der Primer und der Sonde ist nicht identisch mit den von der WHO veröffentlichten Designs. Alle Daten in der NCBI- und GISAID-Datenbank zeigten eine 100%ige Homologie in der Sequenzregion von Primer und Sonde für alle veröffentlichten Sequenzeinträge von SARS-CoV-2. Das Testkreuz reagiert mit dem Fledermaus-Coronavirus RaTG13, dem Coronavirus, das am engsten mit SARS-CoV-2 verwandt ist. Dieser Ansatz ermöglicht den spezifischen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV-2 Stämmen.

Die Spezifität wurde weiters durch Tests gegen Viren, die respiratorische Erkrankungen verursachen sowie SARS-CoV-2 validiert. Insgesamt wurden 22 Ringversuchsproben von INSTAND e.V. retrospektiv analysiert. Alle Proben wurden mit dem ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex korrekt analysiert.

11.6. Diagnostische Evaluierung

Für die diagnostische Evaluierung wurden extern (AGES, Vienna) 94 Proben aus dem Respirationstrakt von Patienten mit Verdacht auf COVID-19 analysiert. Das Testpanel umfasste 47 positiv getestete Proben (Bereich von hoch positiv bis schwach positiv mit Ct-Werten im Bereich von 17-41) und 47 negativ auf SARS-CoV-2 getestete Proben mit dem Abbott RealTime SARS-CoV-2 Assay (Abbott) unter Verwendung des Abbott Alinity m oder des Abbott m2000 real-time PCR Instruments. Der Abbott-RealTime-SARS-CoV-2-Test weist das N und RdRp Gen von SARS-CoV-2 im FAM-Kanal nach und ist mit einer Empfindlichkeit von 100 Kopien/µl Sputum einer der empfindlichsten Tests auf dem Markt. Der ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex hat eine Sensitivität von ca. 893 Kopien/µl Sputum (bei Extraktion von 200 µl Sputum).

Für die Testung mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex wurden jeweils 200 µl Probe mit dem KingFisher Extraktionsgerät extrahiert und in 60 µl eluiert. Die Analysen wurden in Einzelansatz auf dem LightCycler® 480 II Instrument (Roche) mit 5 µl RNA-Probenvolumen durchgeführt.

Resultat: Von den 47 mit der Referenzmethode positiven Proben waren 44 Proben mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex positiv. Drei Proben, die mit der Referenzmethode fraglich schwach positiv waren (Cq>38), waren negativ mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex. Eine Probe negativ getestet mit der Referenzmethode zeigte ein positives Ergebnis mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex. Aufgrund des hohen Cq Wertes (40,9) wird diese Probe als Kontamination bewertet. Die restlichen 46 Proben waren mit beiden Methoden negativ (Tabellen 5, 6).

Der Cq-Wert (Quantification cycle (Cq) = Cycle threshold (Ct) = Crossing point (Cp)) entspricht der Zahl der notwendigen PCR-Zyklen bis zum positiven Signal und ist somit ein Maß für die Viruskonzentration im Probenmaterial. Die Cq-Werte sind jedoch auch von der verwendeten Gerätesoftware und von Abstrich- und Extraktionsmethode abhängig.

Richtlinien für die Interpretation finden sie auf der Webseite des Robert Koch Instituts.

Tabelle 5 Diagnostische Evaluierung von ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex

	Referenz			Total
		pos	neg	
ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex	pos	44 ¹	1 ²	45
	neg	3 ³	46	49
Total		47	47	94

¹ Zwei Proben mit jeweils nur N Gen oder RdRp Gen positiv

² Cq=40,9, als Kontamination gewertet

³ Fraglich schwach positiv mit Referenzmethode (Cq>38)

Tabelle 6 Diagnostische Performance im Vergleich mit Abbott RealTime SARS-CoV-2 Assay

	Wert
Sensitivität	93,6 %
Spezifität	100 %
NPV	93,9 %
PPV	97,8 %

12. Literatur

Huang, Chaolin & Wang, Yeming & Li, Xingwang & Ren, Lili & Zhao, Jianping & Hu, Yi & Zhang, Li & Fan, Guohui & Xu, Jiuyang & Gu, Xiaoying & Cheng, Zhenshun & Yu, Ting & Xia, Jiaan & Wei, Yuan & Wu, Wenjuan & Xie, Xuelei & Yin, Wen & Li, Hui & Liu, Min & Cao, Bin. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet. 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

13. Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung
1.1	13. Oktober 2020	8.2. Platte anschließend mit geeignetem optischen Verschlussmaterial verschließen. 9. Proben mit positiven Cq-Werten werden positiv gewertet (Quantification cycle (Cq) = Cycle threshold (Ct) = Crossing point (Cp)).