

# ViroReal<sup>®</sup> Kit SARS-CoV-2 & SARS

## Gebrauchsanweisung für Kitversion 1.1



CE

IVD

*In-vitro-Diagnostikum*

REF

DHUV02313

Σ

100

REF

DHUV02313x5

Σ

500

REF

DHUV02313x50

Σ

5000

**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.....	3
4. Inhalt, Stabilität und Lagerung.....	4
4.1. Inhalt Bestellnummer DHUV02313 (Version 1.1).....	4
4.2. Inhalt Bestellnummer DHUV02313x5 (Version 1.1) und DHUV02313x50.....	4
5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	5
6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise.....	6
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 Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe.....	10
10.2. Erreger-Signal (FAM 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.....	10
10.5. Kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Probe.....	10
11. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance.....	11
11.1. Testperformance.....	11
11.2. Nachweisgrenze und Linearität.....	12
11.2.1. LoD.....	12
11.2.2. Linearität.....	13
11.3. Inter-Assay-Präzision.....	13
11.4. Intra-Assay-Präzision.....	13
11.5. Analytische Spezifität.....	13
11.6. Diagnostische Evaluierung.....	14
12. Literatur.....	15
13. Änderungsindex.....	15

## Erklärung der Symbole



Chargen-Bezeichnung



Bestell-Nummer



Ausreichend für "n" Ansätze

Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für *in-vitro* Diagnostika

Ätzwirkung, GHS05



Verwendbar bis



Hersteller



Aufbewahrung bei

*In-vitro* Diagnostikum

Ausrufezeichen, GHS07

## 1. Verwendungszweck

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS ist ein *in-vitro* Diagnostik Test zum Nachweis von RNA für das N Gen von SARS-CoV-2, SARS-CoV und SARS-ähnlichen CoV (Sarbecoviren) 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 & SARS erkennt das Nukleokapsid Protein Gen (N Gen) von SARS-CoV-2, SARS-CoV und SARS-ähnlichen CoV (Sarbecoviren). Andere Beta-Coronaviren werden mit diesem Test nicht nachgewiesen. Die gewählten Primer und Sonden sollen mögliche zukünftige Änderungen der Virussequenz abdecken und sind nicht identisch mit den von der WHO publizierten Primern und Sonden. Dieser Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV Stämme, einschließlich SARS-CoV-2 und SARS-ähnlichen CoV, ohne zwischen Stämmen zu unterscheiden.

Eine sondenspezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM (530 nm) zeigt die Amplifikation von Virus-spezifischer RNA an.

Die interne RNA Positivkontrolle (RNA IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert und dient als Kontrolle der RNA Extraktion und als 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 und Cy5 Kanal messen und differenzieren können.

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS wurde mit Applied Biosystems® (ABI) 7500 instrument (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent), qTOWER<sup>3</sup>G (analytic jena), MIC instrument (bio molecular systems), LightCycler® 480 I (Roche) und cobas Z 480 Analyzer (Roche) validiert.

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. In den meisten Fällen wird ein leichter Verlauf der Infektion beobachtet, in etwa 15%-20% der Fälle verläuft die Erkrankung jedoch schwer, die Sterblichkeitsrate liegt bei bis zu 3%.

## 4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

### 4.1. Inhalt Bestellnummer DHUV02313 (Version 1.1)

		DHUV02313	
Beschriftung	Inhalt	Menge 100 Reaktionen	Lagerung
SARS-CoV-2 & SARS + RNA IPC-3 Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde für Virus Detektion (FAM) und für RNA IPC Detektion (Cy5)	1 x 100 µl	-15°C bis -25°C
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC	1 x 100 µl	-15°C bis -25°C
SARS-CoV-2 Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (10 <sup>3</sup> Kopien/µl)	1 x 120 µl	-15°C bis -25°C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktionsmix	1 x 500 µl	-15°C bis -25°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-15°C bis -25°C

### 4.2. Inhalt Bestellnummer DHUV02313x5 (Version 1.1) und DHUV02313x50

		DHUV02313x5	DHUV02313x50	
Beschriftung	Inhalt	Menge 500 Reaktionen	Menge 5000 Reaktionen	Lagerung
SARS-CoV-2 & SARS + RNA IPC-3 Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde für Virus Detektion (FAM) und für RNA IPC	1 x 500 µl	1 x 5 ml	-15°C bis -25°C
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC	1 x 500 µl	1 x 5 ml	-15°C bis -25°C
SARS-CoV-2 Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (10 <sup>3</sup> Kopien/µl)	1 x 300 µl	1 x 1 ml	-15°C bis -25°C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktionsmix	5 x 500 µl	1 x 25 ml	-15°C bis -25°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	3 x 1000 µl	1 x 25 ml	-15°C bis -25°C

Die Komponenten des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS 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
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße und geeignetes optisches Verschlussmaterial

**ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS wurde mit folgenden real-time PCR Geräten validiert:**

- Applied Biosystems® (ABI) 7500 instrument (Thermo Fisher Scientific)
- Mx3005P® (Agilent)
- qTOWER<sup>3</sup>G (analytic jena)
- MIC instrument (bio molecular systems)
- LightCycler® 480 I (Roche)
- cobas Z 480 Analyzer (Roche)

**ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS wurde mit folgenden Extraktionskits validiert:**

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)
- Mag-Bind® Viral RNA XPress KIT (Omega Bio-tek)

## 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](http://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.
- Der Test ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV Stämmen, einschließlich SARS-CoV-2 und SARS-ähnlichen CoV, ohne zwischen Stämmen zu unterscheiden.
- Obwohl dieser Test hochspezifische Primer und Sonde beinhaltet, können eventuell vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Target-Region von bislang nicht bekannten klinischen Subtypen zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen.
- 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.

→ **Als Kontrolle der Extraktion und RT real-time PCR:** Das RNA IPC Target (ca.  $6 \times 10^5$  Kopien/µl) 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 Positivkontrolle** ist eine *in vitro* synthetisierte RNA mit einer Konzentration von  $10^3$  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 Positive Control (roter Verschluss). Die Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

### 8.2. Pipettierschema

		<b>Pro Probe</b>
<b>Ansetzen Master Mix</b> (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	4.0 µl
	RNA Reaction Mix	5.0 µl
	SARS-CoV-2 & SARS + RNA IPC-3 Assay Mix	1.0 µl
	<b>Gesamtvolumen Master Mix</b>	<b>10.0 µl</b>
<b>Ansetzen PCR-Reaktion</b>	Master Mix	10.0 µl
	RNA-Probe*	10.0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20.0 µl</b>

\*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 zum Schluss.

### 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 <b>Reverse Transcription</b>	Cycles: 1 Analysis: None <b>Polymerase Activation</b>	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:** Detektion von SARS-CoV-2 oder SARS-CoV

**Cy5-NONE:** Detektion von IPC

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

#### **Für cobas z 480 Analyzer (Roche):**

**FAM:** Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

**Cy5:** Anregung bei 610 nm, Emission bei 670 nm

Detection format: 2 Color Hydrolysis Probe, kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

#### **Für LightCycler® 480 II (Roche):**

**FAM:** Anregung bei 465, Emission bei 510 nm

**Cy5:** Anregung bei 618, Emission bei 670 nm

Detection format: 2 Color Hydrolysis Probe, kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

#### **Für MIC Instrument (bio molecular systems):**

**FAM:** Green

**Cy5:** Red

Kein ROX als Referenzfarbstoff nötig

## 9. Interpretation der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM Kanal für das Virus Target und Cy5 Kanal für das RNA IPC Target. Proben mit positiven Ct- oder Cp-Werten werden positiv gewertet.

**Wichtig:** Überprüfen Sie neben den Ct-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

	Ct FAM Kanal Pathogen Target	Ct Cy5 Kanal RNA IPC Target <sup>1</sup>	Interpretation	Vorgehensweise
<b>Positivkontrolle</b>	26-28	Negativ	Valid	-
<b>Positivkontrolle</b>	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
<b>Positivkontrolle</b>	26-28	Positiv	Invalid	Siehe 10.4
<b>Negativkontrolle der RNA-Extraktion</b>	Negativ	25-28	Valid	-
<b>Negativkontrolle der RNA-Extraktion</b>	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.1
<b>Negativkontrolle der RNA-Extraktion</b>	Positiv	25-28	Invalid	Siehe 10.3
<b>Negativkontrolle (optional)</b>	Negativ	Negativ	Valid	-
<b>Negativkontrolle (optional)</b>	Positiv	Negativ	Invalid	Siehe 10.2
<b>Negativkontrolle (optional)</b>	Negativ	Positiv	Invalid	Siehe 10.4

<sup>1</sup>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 Kontrollen nicht valid sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

**Tabelle 2** Interpretation der klinischen Proben

	Ct FAM channel Pathogen Target	Ct Cy5 Kanal RNA IPC Target	Interpretation	Vorgehensweise
<b>Klinische Probe</b>	Negativ	25-28 <sup>1</sup>	Negativ	-
<b>Klinische Probe</b>	Positiv	Positiv	Positiv	-
<b>Klinische Probe</b>	Positiv	Negativ <sup>2</sup>	Positiv	-
<b>Klinische Probe</b>	Negativ	Negativ	Invalid	Siehe 10.5

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

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

## 10. Troubleshooting

### 10.1. Kein Signal im FAM 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 (FAM 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 10.2.

### 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 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 & SARS mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

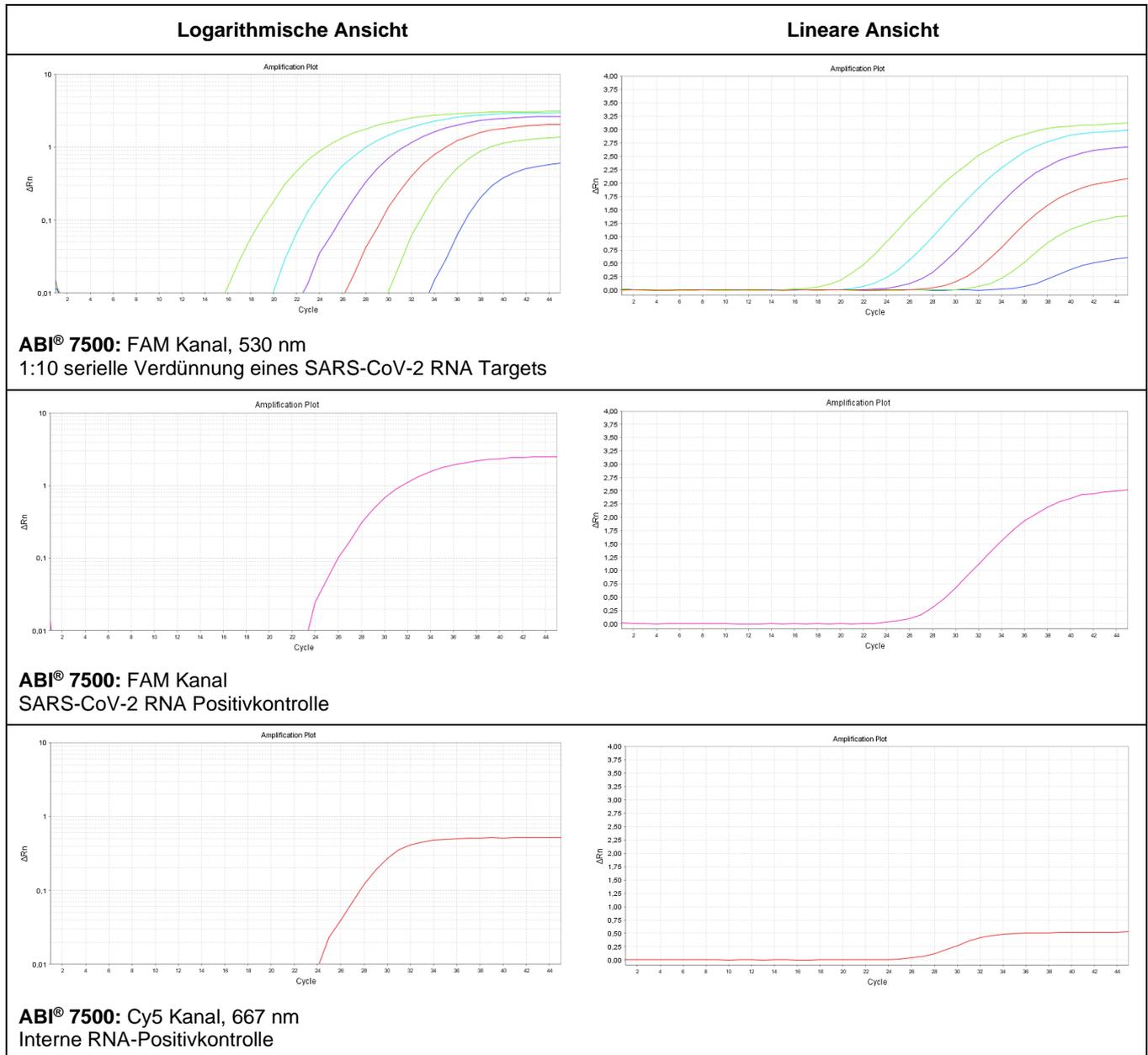


Abbildung 2. Performance des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS am ABI® 7500 Instrument

Um die Kompatibilität des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS mit verschiedenen real-time PCR Geräten zu testen, wurden SARS-CoV-2-negative Sputumextrakte 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), qTOWER<sup>3</sup>G (analytic jena), MIC-Instrument (bio molecular systems), LightCycler® 480 I (Roche) und cobas Z 480 Analyzer (Roche). Die Resultate zeigten vergleichbare Ergebnisse der analytische Sensitivität, unabhängig von den verwendeten Amplifikationsplattformen, siehe Tabelle 4.

**Tabelle 1:** Validierung unterschiedlicher real-time PCR Geräte mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS

	Ct Mittelwerte					
	ABI® 7500	MIC	qTOWER <sup>3</sup> G	Mx3005P®	cobas Z 480	LightCycler® 480 I
100 Kopien	30,98	34,92	32,44	32,31	31,65	31,73
50 Kopien	32,11	35,95	33,61	33,49	32,78	33,34
25 Kopien	32,31	36,01	34,22	33,99	33,51	34,24
12,5 Kopien	33,46	37,83	35,39	35,36	34,77	36,41
6 Kopien	34,22	38,38	36,12	36,09	36,74	41,77
3 Kopien	34,65	39,06	37,36	36,12	37,32	negativ

## 11.2. Nachweisgrenze und Linearität

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS wurde mit einer 10-fach Verdünnungsreihe einer synthetischen RNA, die Teile der SARS-CoV-2 Virus RNA repräsentiert, getestet. Es konnte mindestens eine Target Kopie/Reaktion nachgewiesen werden.

### 11.2.1. LoD

Zur Bestimmung der LoD wurde eine kommerziell erhältliche SARS-CoV-2 RNA (AMPLIRUN® Coronavirus SARS-CoV-2 RNA-Control, Vircell, Bestell-Nr. MBC137-R) seriell in Sputum (1:1 mit Sputasol versetzt) verdünnt und extrahiert. Die Extraktionen wurden mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (140 µl Sputum extrahiert, RNA in 60 µl eluiert) durchgeführt und die real-time PCR wurde mit dem ABI® 7500 Instrument getestet. Die LoD wurde bestimmt, indem verschiedene Konzentrationen in 20 Replikaten extrahiert und getestet wurden. Die LoD (Anzahl an Kopien, welche in 95% von 20 Extraktionen positiv detektiert wurden) betrug **893 Kopien/ml Sputum**, dies entspricht ca. **21 Kopien/PCR-Reaktion**.

Um die Kompatibilität des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS mit dem Mag-Bind® Viral RNA XPress KIT (Omega-Biotec) zu validieren, wurde die Extraktion mit SARS-CoV-2 negativem Sputum durchgeführt, das mit verschiedenen Konzentrationen der AMPLIRUN® Coronavirus SARS-CoV-2 RNA-Kontrolle (2678, 1786, 893 und 446 Zielkopien/ml Sputum) versetzt wurde. Volumina von 140 µl Sputum wurden extrahiert und in 60 µl eluiert. Jede Konzentration wurde in drei Replikaten extrahiert. Die real-time PCR wurde mit dem ABI® 7500 Instrument durchgeführt.

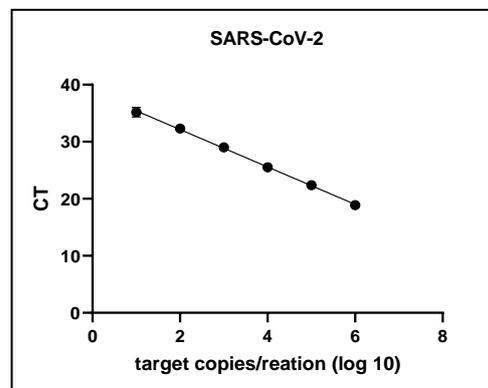
Die Resultate zeigten vergleichbare Ergebnisse der analytischen Sensitivität, unabhängig von der verwendeten Extraktionsplattform, siehe Tabelle 5.

**Tabelle 2** Validierung von zwei Extraktionsmethoden mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS

Target Kopien/ml Sputum	Getestetes System	
	QIAamp Viral RNA Mini Kit	Mag-Bind® Viral RNA XPress KIT
3570	Nicht getestet	3/3 positiv
2678	Nicht getestet	Nicht getestet
1786	20/20 positiv	3/3 positiv
893 (LoD)	19/20 positiv	2/3 positiv
446	2/4 positiv	1/3 positiv
223	1/4 positiv	Nicht getestet

### 11.2.2. Linearität

Die **Linearität** wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsreihe einer synthetischen RNA ermittelt. Der Test zeigt zwischen 10 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von -3,28 und einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,99$  (Abbildung 3).

**Abbildung 3** 10-fache Verdünnungsreihe einer synthetischen SARS-CoV-2 RNA

### 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 & SARS 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 im Bereich 0,3% bis 1,88%, mit einer mittleren Gesamt-Inter-Assay-Präzision von 0,85%.

### 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 & SARS wurde aus den Wiederholungsläufen von Punkt 11.3 bestimmt.

Die Variationskoeffizienten lagen im Bereich von 0,33% bis 2,90% mit einer mittleren Gesamt-Intra-Assay-Präzision von 0,97%.

### 11.5. Analytische Spezifität

Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonde gewährleistet. Eine hochkonservierte Region in allen SARS-Coronavirus Clustern des N Gens wurde als Target-Region ausgewählt. Die gewählten Primer und Sonde sollen mögliche zukünftige Änderungen der Virussequenz abdecken und sind nicht identisch mit den von der WHO publizierten Primern und Sonden. *In silico* Validierung der Primer und Sonde 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.

Alle Daten in der NCBI-Datenbank zeigten Homologie der Sequenzregion von Primer und Sonde in allen SARS-Coronavirus Clustern. Dieser Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV Stämme, einschließlich SARS-CoV-2 und SARS-ähnlichen CoV, ohne zwischen Stämmen zu unterscheiden.

Das ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS erkennt spezifisch das N Gen von SARS-CoV-2, SARS-CoV und und SARS-ähnlichen CoV. Andere Beta-Coronaviren werden mit diesem Test nicht nachgewiesen.

## 11.6. Diagnostische Evaluierung

Für die diagnostische Evaluierung wurde extern (AGES, Vienna) eine serielle Verdünnung eines SARS-CoV-2-positiven RNA Abstrich-Extrakts in Triplikaten mit dem ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS getestet und mit einem in-house Test verglichen, siehe Tabelle 6.

Weiters wurden extern (AGES, Vienna) 94 Proben aus dem Respirationstrakt von Patienten mit Verdacht auf COVID-19 analysiert. Die RNA Extraktion erfolgte mit dem MagNA Pure Compact unter Verwendung des Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche). Real-time PCR Analysen wurden im Einzelansatz auf dem LightCycler® 480 I Instrument (Roche) durchgeführt.

In-house Test (Referenzmethode): Die Ergebnisse wurden mit Ergebnissen eines real-time PCR Tests verglichen, welcher das E Gen von SARS-CoV-2 detektiert, basierend auf den Empfehlungen der WHO: Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) (Victor M Corman et al., 2020).

Von den 94 Proben waren 15 Proben mit beiden Methoden positiv. Eine Probe negativ mit der Referenzmethode zeigte ein positives Ergebnis mit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS. Aufgrund des hohen Cp Wertes (35,5) und bezogen auf die in Tabelle 5 dargestellten Daten wird diese Probe als positiv betrachtet, mit einer angenommenen niedrigen Konzentration von SARS-CoV-2 RNA im Bereich um die Nachweisgrenze, was das negative Testergebnis mit der Referenzmethode erklären würde. Die restlichen 78 Proben waren mit beiden Methoden negativ (Tabelle 7).

**Tabelle 3** Serielle Verdünnung eines SARS-CoV-2 positiven RNA Extrakts getestet in Triplikaten

Verdünnung Abstrich-Extrakt	E Gen (Referenzmethode)		N Gen ViroReal® Kit SARS-CoV-2	
	Ct Mittelwert	$\sigma$	Ct Mittelwert	$\sigma$
1:100	25,80	0,05	24,80	0,09
1:1000	29,40	0,12	28,80	0,06
1:10.000	32,50	0,20	30,50	0,02
1:100.000	37,40	2,36	32,90	0,20
1:1.000.000	39,50	0,51	35,80	0,86

**Tabelle 7** Diagnostische Evaluierung von ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS

	Referenz			Total
		pos	neg	
ViroReal® Kit SARS-CoV-2	pos	15	1*	16
	neg	0	78	78
Total		15	79	94

\*Schwach positiv, Cp Wert = 35,5

**Tabelle 8** Diagnostische Performance

	Wert	95% CI
Sensitivität	100 %	79,41% bis 100,00%
Spezifität	100 %	95,38% bis 100,00%
NPV	100 %	100 %
PPV	100 %	100 %
Prevalenz	17,02 %	10,05% bis 26,16%

## 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
1.0de	20.03.2020	
1.1	06.04.2020	<p>Neue Kit-Version 1.1 für die Bestellnummern DHUV02313 (100 Reaktionen) und DHUV02313x5 (500 Reaktionen) eingeführt. Änderungen betreffen nur die Füllung und Anzahl der Reaktionsgefäße, die Testperformance selbst wurde nicht verändert. Dies betrifft Lots, die nach dem 03.04.2020 produziert wurden.</p> <p>4.2. Der Kit mit der Bestellnummer DHUV02353 (50 Reaktionen) ist nicht mehr erhältlich. Neue Bestellnummer DHUV02313x50 (5.000 Reaktionen) ist verfügbar.</p> <p>Kit mit der Bestellnummer DHUV02313 (100 Reaktionen) Version 1.1: Der SARS-CoV-SARS-Assay-Mix und der RNA IPC-3-Assay-Mix wurden in einem Assay-Mix (100 µl, grüner Deckel) kombiniert. Der RNA-Reaktionsmix (500 µl) ist in ein 0,5 ml Röhrchen gefüllt.</p> <p>Kit mit der Bestellnummer DHUV02313x5 (500 Reaktionen) Version 1.1: Der SARS-CoV-2 &amp; SARS + RNA IPC-3 Assay Mix (500 µl) ist in ein 0,5-ml-Röhrchen gefüllt.</p> <p>8.1. Pipettierschema geändert</p> <p>10.2. Troubleshooting: Information hinzugefügt, dass im Falle eines Anstiegs des Hintergrundrauschens im NTC der Threshold angepasst werden muss.</p> <p>Der Anhang enthält Informationen über den Kitinhalt und das Pipettierschema der Vorgängerversion.</p>
1.2de	13.08.2020	<p>1. Aktualisierte Informationen zum Verwendungszweck</p> <p>4.2. DHUV02313x5: SARS-CoV-2 Positivkontrolle von 120 µl auf 300 µl geändert</p> <p>5. Aktualisierte Informationen über validierte Echtzeit-PCR-Instrumente und Extraktionskits</p> <p>7. Aktualisierte Informationen über Einschränkungen</p> <p>8. Aktualisierte Informationen zur Probensammlung</p> <p>8.4. Informationen zum Detektionskanal für Mic-Instrument hinzugefügt</p> <p>9. Aktualisierte Informationen zur Interpretation der Daten</p> <p>10. Aktualisierte Informationen zur Fehlerbehebung</p> <p>11.1. Aktualisierte Informationen zur Performance des Kits auf verschiedenen real-time PCR-Instrumenten</p> <p>11.2.1. Aktualisierte Informationen zur LoD pro ml extrahiertem Sputum</p> <p>Anhang entfernt</p>
1.3 de	03.09.2020	<p>1. Rachenspülungen wurden hinzugefügt</p> <p>8. Negativkontrolle der RNA-Extraktion muss durchgeführt werden.</p> <p>9. Tabellen 1 wurde korrigiert, Tabelle 2 entfernt.</p> <p>10.2 Abbildung 1 wurde entfernt</p>