

Wichtiger Hinweis:

Version 2.0 der Gebrauchsinformation
und des real time RT-PCR-Kits.

Veränderungen in der Version 2.0 sind
hervorgehoben.

Gebrauchsinformation

virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0

Für den gleichzeitigen *In vitro*-Nachweis der RNA des neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) und der RNA des Subgenus Sarbecovirus (SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2), extrahiert aus biologischen Proben.

REF

G01128-96

G01128-384



96

384



gerbion GmbH & Co.KG
Remsstr. 1
70806 Kornwestheim
Telefon: 07154 806 20 0
Fax: 07154 806 20 29
e-mail: info@gerbion.com
www.gerbion.com

IVD



Vertrieb:



Hauptstraße 54

D – 64560 Riedstadt

WEB: www.AlphaScience.de



06158-74 804-0



06158-74 804-22



customerservice@alphascience.de

Inhaltsverzeichnis

1.	Verwendungszweck	3
2.	Informationen zum Pathogen	3
3.	Testprinzip	3
4.	Inhalt.....	4
5.	Zusätzlich benötigte Materialien und Ausstattung	4
6.	Transport, Lagerung und Stabilität	5
7.	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	5
8.	Probenmaterial	6
9.	Probenvorbereitung.....	6
10.	Kontroll-RNA	6
11.	Real time RT-PCR	7
11.1	Wichtige Informationen vor der Anwendung	7
11.2	Durchführung.....	7
11.3	Geräte-Einstellungen.....	9
12	Daten-Analyse.....	11
13	Validierung des Assays.....	13
14.	Grenzen der Methode	15
15.	Fehlerbehebung.....	15
16.	Leistungsfähigkeit des Tests.....	17
16.1	Analytische Sensitivität	17
16.2	Analytische Spezifität.....	17
16.3	Klinische Proben.....	19
16.4	Linearer Messbereich.....	20
16.5	Präzision	21
16.6	Diagnostische Sensitivität	22
17.	Abkürzungen und Symbole	23
18.	Literatur	23

1. Verwendungszweck

Der virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0 ist ein Screening-Assay zum gleichzeitigen Nachweis der RNA des neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) und der RNA des Subgenus Sarbecovirus (SARS-verwandte Betacoronaviren: SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2), extrahiert aus biologischen Proben.

2. Informationen zum Pathogen

Coronaviren (CoV) sind eine große Familie von Viren, die verschiedene Krankheiten, von der gewöhnlichen Erkältung bis hin zu schwereren Erkrankungen wie z.B. MERS-CoV (= Middle East Respiratory Syndrom) und SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome), verursachen. Das neuartige Coronavirus (SARS-CoV-2) ist ein neuer Stamm innerhalb der Sarbecoviren, der erst kürzlich bei Menschen identifiziert wurde und die Lungenkrankheit COVID-19 verursacht.

Coronaviren sind zoonotisch, d.h. sie können zwischen Tieren und Menschen übertragen werden. Genauere Untersuchungen ergaben, dass SARS-CoV von der Zibetkatze und MERS-CoV von Dromedaren auf den Menschen übertragen wurde. Verschiedene andere bekannte Coronaviren, die bislang keine Menschen infiziert haben, zirkulieren in zoologischen Populationen.

Häufige Anzeichen einer Infektion sind Atemwegsbeschwerden, Fieber, Husten, Kurzatmigkeit und Atemnot. In schwereren Fällen kann die Infektion eine Lungenentzündung (Pneumonie), ein schweres akutes Atemwegssyndrom, Nierenversagen und sogar den Tod hervorrufen.

Standardempfehlungen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern, umfassen das regelmäßige Händewaschen, die Bedeckung von Mund und Nase bei Husten und Schnupfen und das gründliche Kochen von Fleisch und Eiern. Enger Kontakt zu Personen mit Symptomen von Atemwegserkrankungen wie Husten und Schnupfen ist zu vermeiden.

3. Testprinzip

Der virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0 enthält spezifische Primer und zweifach-markierte Sonden zur Amplifizierung der RNA (cDNA) von SARS-CoV-2 (RdRP-Gen und S-Gen, FAM-Kanal) und der RNA (cDNA) des Subgenus Sarbecovirus (SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2, E-Gen, Cy5-Kanal), extrahiert aus biologischen Proben. Sowohl das E-Gen als auch das RdRP-Gen werden von der WHO als Zielsequenz des viralen Genoms empfohlen. Der gleichzeitige Nachweis von 3 Zielsequenzen (RdRP-Gen, S-Gen und E-Gen) erhöht die diagnostische Sicherheit, sogar im Falle einer Mutation innerhalb der Zielsequenz.

Darüber hinaus enthält der *virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0* eine Kontroll-RNA für die interne Prozesskontrolle (IPC), welche während der RNA-Extraktion hinzugefügt und in derselben Reaktion durch eine HEX-markierte Sonde nachgewiesen wird. Die Kontroll-RNA erlaubt den Nachweis einer RT-PCR-Inhibition und dient als Kontrolle dafür, dass die Nukleinsäure aus der biologischen Probe isoliert wurde.

Zusätzlich beinhaltet der *virella-SARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0* eine interne Systemkontrolle (ISC). Die ISC besteht aus Primern und Sonden zum Nachweis eines *Housekeeping*-Gens (Beta-Aktin, bei vielen Spezies) im Eluat einer biologischen Probe. Durch die ISC werden falsch-negative Ergebnisse, die auf insuffizienter Probengewinnung oder dem Transport beruhen, vermieden. Die Amplifikation der Beta-Aktin-Zielsequenz wird im ROX-Kanal gemessen.

4. Inhalt

Die gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 bzw. 384 Reaktionen.

Tabelle 1: Bestandteile des *virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0*.

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		96	384
Reaktionsmix	gelb	1 x 1325 µl	4 x 1.325 µl
Enzyme	blau	1 x 19,2 µl	4 x 19,2 µl
Positivkontrolle	rot	1 x 150 µl	1 x 150 µl
Negativkontrolle	grün	1 x 150 µl	1 x 150 µl
Kontroll-RNA	farblos	1 x 480 µl	5 x 480 µl

5. Zusätzlich erforderliche Materialien und Geräte

- RNA-Isolationskit (z.B. NukEx Pure RNA/DNA, **gerbion** Best.-Nr. G05004, NukEx Mag RNA/DNA, **gerbion** Best.-Nr. G05012 oder NukEx Mag respira, **gerbion** Best.-Nr. G05026)
- Sterile Mikroreaktionsgefäße
- Pipetten (adjustierbare Volumina)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex
- Real time PCR-Gerät
- optische PCR-Mikroreaktionsgefäße mit Verschluss oder optische PCR-Mikrotiterplatte mit optischer Verschlussfolie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6. Transport, Lagerung und Stabilität

Der virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0 wird auf Trockeneis oder Kühlelementen geliefert. Alle Komponenten müssen direkt nach Erhalt bei maximal -18°C im Dunklen gelagert werden. Reagenzien nach dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr verwenden. Bis zu 20 Auftau- und Einfrierzyklen sind möglich. Nach Anbruch der Reagenzien können diese bei 2 bis 8 °C für maximal 6 Monate gelagert werden. Kit-Komponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Vor der Verwendung des Produkts die Gebrauchsinformation sorgfältig lesen. Vor dem ersten Gebrauch das Produkt und seine Komponenten überprüfen.

- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in die Techniken der Real-Time-PCR-Verfahren eingewiesen und dafür geschult wurde.
- Proben sind immer als infektiös und/oder biogefährdend und in Übereinstimmung mit den Laborsicherheitsbestimmungen zu behandeln.
- Mikrobiologische und Nuklease- (DNase/RNase) Kontaminationen des Eluates und der Kit-Komponenten sind zu vermeiden.
- Stets DNase/RNase-freie Einmal-Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren verwenden.
- Beim Umgang mit Kit-Komponenten stets puderfreie Einweghandschuhe tragen.
- Räumlich getrennte und voneinander abgeschlossene Arbeitsbereiche für (1) Probenvorbereitung, (2) Reaktionsaufbau und (3) Amplifikation/Nachweis-Aktivitäten nutzen. Der Arbeitsablauf im Labor sollte unidirektional verlaufen. In jedem Bereich Einmal-Handschuhe tragen und diese vor Eintritt in einen anderen Bereich wechseln.
- Vorräte und Ausstattung den verschiedenen Arbeitsbereichen zuordnen und nicht von einem Bereich in den anderen überführen.
- Positives und/oder potentiell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits aufbewahren.
- Die Reaktionsgefäße/-platten dürfen nach der Amplifikation nicht geöffnet werden, um Kontaminationen mit Amplifikaten zu vermeiden.
- Zusätzliche Kontrollen können entsprechend den Richtlinien bzw. Anforderungen von lokalen, Landes- und/oder Bundesvorschriften sowie Akkreditierungsorganisationen mitgeführt werden.

- Die verwendeten Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da hierbei die amplifizierten Nukleinsäuren nicht abgebaut werden und das Risiko einer Kontamination des Laborbereichs besteht.
- Proben- und Assay-Abfälle entsprechend den lokalen Sicherheitsvorschriften entsorgen.

8. Probenmaterial

Ausgangsmaterial für den virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0 ist aus biologischem Probenmaterial (z.B. Tupfer, Sputum, Stuhlproben) isolierte RNA.

9. Probenvorbereitung

Für die RNA-Isolierung werden kommerziell erhältliche Extraktionskits wie die Folgenden empfohlen:

- NukEx Pure RNA/DNA, **gerbion**, Best.-Nr. G05004
- NukEx Mag RNA/DNA, **gerbion**, Best.-Nr. G05012
- NukEx Mag respira, **gerbion**, Best.-Nr. G05026

Die Extraktion erfolgt gemäß der Gebrauchsinformation des jeweiligen Kits.

Wichtig:

Zusätzlich zu den Proben sollte bei der Extraktion immer eine „Wasserkontrolle“ mitgeführt werden, die wie eine Probe behandelt wird. Der Vergleich der Amplifikation der Kontroll-RNA in den Proben mit der Amplifikation der internen Kontrolle in der Wasserkontrolle liefert Einblicke in mögliche Inhibitionen der real time RT-PCR. Darüber hinaus sind mögliche Kontaminationen während der RNA-Extraktion nachweisbar.

Bitte auch Kapitel 10, „Kontroll-RNA“ beachten.

Falls die real time RT-PCR nicht unverzüglich durchgeführt wird, ist die extrahierte RNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufzubewahren.

10. Kontroll-RNA

Die mitgelieferte Kontroll-RNA kann als Extraktionskontrolle oder nur als Inhibitionskontrolle genutzt werden. Dies ermöglicht die Kontrolle der RNA-Isolationsprozedur und die Überprüfung auf eine mögliche Inhibition der real time RT-PCR.

a) Kontroll-RNA als Extraktionskontrolle:

5 µl Kontroll-RNA zu jeder Extraktion hinzugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Die Extraktion gemäß der Anleitung des Herstellers durchführen und dem Protokoll A folgen (s. Abschnitt 11.2, „Durchführung“).

Die Kontroll-RNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

b) Kontroll-RNA als interne Kontrolle der real time RT-PCR:

Wenn nur eine Inhibition überprüft werden soll, Protokoll B folgen (s. Abschnitt 11.2, „Durchführung“).

11. Real time RT-PCR

11.1. Wichtige Informationen vor der Anwendung:

- Die wichtigen Hinweise im Kapitel 7, „Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen“ beachten.
- Vor dem Ansetzen der real time RT-PCR sich mit dem real time PCR-Gerät vertraut machen und die mitgelieferte Gebrauchsinformation lesen.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die real time RT-PCR angesetzt wird.
- In jedem PCR-Lauf sollten mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein.
- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch vollständig aufgetaut, gründlich gemischt und kurz anzentrifugiert werden.
- Aufgrund der hohen Viskosität des Enzyms (blaue Kappe) wird ein Vorwärmen von 15 Minuten bei Raumtemperatur empfohlen.

11.2. Durchführung

Wenn die Kontroll-RNA gleichzeitig als Extraktionskontrolle der RNA-Isolierung und als Inhibitionskontrolle der real time RT-PCR genutzt werden soll, ist Protokoll A anzuwenden. Wenn mit der Kontroll-RNA ausschließlich eine mögliche Inhibition der real time RT-PCR festgestellt werden soll, ist Protokoll B anzuwenden.

Protokoll A

Die Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion hinzugefügt (s. Kapitel 10, „Kontroll-RNA“). In diesem Fall ist der Master-Mix entsprechend Tabelle 2 vorzubereiten.

Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle benötigten Kompo-

nungen für die real time RT-PCR. Für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt ansetzen, um einen eventuellen Pipettierverlust auszugleichen.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mixes (Kontroll-RNA wurde während der RNA-Extraktion zugefügt).

Volumen pro Reaktion	Volumen Master-Mix
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)

Protokoll B

Die Kontroll-RNA dient ausschließlich als Inhibitionskontrolle der real time RT-PCR (s. Kapitel 10, „Kontroll-RNA“). In diesem Fall ist der Master-Mix entsprechend der Tabelle 3 vorzubereiten.

Der Master-Mix enthält mit Ausnahme der Probe alle benötigten Komponenten für die real time RT-PCR. Für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt ansetzen, um einen eventuellen Pipettierverlust auszugleichen.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mixes (Kontroll-RNA wird direkt dem Master-Mix hinzugefügt).

Volumen pro Reaktion	Volumen Master-Mix
13,8 µl Reaktionsmix	13,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzym	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Kontroll-RNA*	0,2 µl x (N+1)*

*Die Volumenzunahme durch Zugabe der Kontroll-RNA wird bei der Vorbereitung des RT-PCR-Assays nicht berücksichtigt.

Protokoll A und B: Ansetzen der real time RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Mikroreaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Halterung des verwendeten real time PCR-Geräts einsetzen bzw. eine optische PCR-Mikrotiterplatte verwenden.
- **14 µl** des Master-Mixes in jedes Mikroreaktionsgefäß bzw. in die entsprechende Kavität der optischen Mikrotiterplatte pipettieren.
- **6 µl** der isolierten RNA (inklusive Eluate der Wasserkontrollen), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in die entsprechenden Mikroreaktionsgefäße bzw. in die entsprechende Kavität der optischen PCR-Mikrotiterplatte pipettieren (s. Tabelle 4).

- Die optischen Mikroreaktionsgefäße/die optische PCR-Mikrotiterplatte sofort nach der Probenzugabe verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der real time RT-PCR.

Komponente	Volumen
Master-Mix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

11.3. Geräte-Einstellungen

Für die real time RT-PCR das in Tabelle 5 angegebene Temperaturprofil verwenden.

Tabelle 5: Real time RT-PCR-Temperaturprofil.

Beschreibung	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
<i>Reverse Transkription</i>	10 min	45°C	1
<i>Initiale Denaturierung</i>	5 min	95°C	1
<i>Amplifikation der cDNA</i>			
Denaturierung	10 Sek.	95°C	45
Annealing und Extension	40 Sek.	60°C	
	Messung am Ende dieses Schrittes		

Abhängig vom verwendeten real time PCR-Gerät sind weitere Geräteeinstellungen entsprechend Tabelle 6 vorzunehmen.

Tabelle 6: Übersicht erforderlicher Geräte-Einstellungen für die virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR 2.0.

Real time PCR-Gerät	Parameter Reaktionsmix 1	Detektionskanal	Bemerkungen		
			Color Compensation Kit SARS-CoV-2 seqc (Best.-Nr. G070MP2-CC) erforderlich		
			Schmelz-Faktor	Quant.-Faktor	Max. Integrationszeit (Sek.)
LightCycler 480II	RdRP-Gen/S-Gen	465-510	1	10	1
	Kontroll-RNA (IPC)	533-580	1	10	2
	ISC	533-610	1	10	2
	E-Gen	618-660	1	10	3
Stratagene Mx3000/ Mx3005P	RdRP-Gen/S-Gen	FAM	Gain 8		
	Kontroll-RNA (IPC)	HEX	Gain 1		Referenzfarbstoff: Keiner
	ISC	ROX	Gain 1		
	E-Gen	Cy5	Gain 4		
AriaMx Bio-Rad CFX96	RdRP-Gen/S-Gen	FAM			
	Kontroll-RNA (IPC)	HEX			Referenzfarbstoff: Keiner
	ISC	ROX			
	E-Gen	Cy5			
ABI 7500	RdRP-Gen/S-Gen	FAM			
	Kontroll-RNA (IPC)	JOE			
	ISC	ROX			Option Referenzfarbstoff ROX: KEINE
	E-Gen	Cy5			
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	RdRP-Gen/S-Gen	Grün	Gain 5		
	Kontroll-RNA (IPC)	Gelb	Gain 5		
	ISC	Orange	Gain 5		
	E-Gen	Rot	Gain 5		
Mic qPCR Cyclcr	RdRP-Gen/S-Gen	Grün	Gain 8		
	Kontroll-RNA (IPC)	Gelb	Gain 10		
	ISC	Orange	Gain 10		
	E-Gen	Rot	Gain 10		

12. Daten-Analyse

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Signal/C _T -Werte				Interpretation
FAM-Kanal RdRP-Gen S-Gen	Cy5-Kanal E-Gen	ROX-Kanal ISC	HEX-Kanal Kontroll-RNA	
positiv	negativ	positiv oder negativ	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2-RNA.
positiv	positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-CoV-2-RNA.
negativ	positiv	positiv oder negativ	positiv oder negativ*	Positives Ergebnis, die Probe enthält SARS-Cov-2-RNA oder SARS-Cov-1-RNA*.
negativ	negativ	positiv	≤ 34	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder SARS-CoV-2-RNA noch SARS-Cov-1-RNA*.
negativ	negativ	negativ	≤ 34	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Menge oder Qualität des Probenmaterials ist nicht ausreichend.
negativ	negativ	positiv	negativ oder > 34	Vorsicht! Die real time RT-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der RNA/DNA-Extraktion auf.
negativ	negativ	negativ	negativ oder > 34	Vorsicht! Die real time RT-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der RNA/DNA-Extraktion auf. Menge oder Qualität des Probenmaterials sind nicht ausreichend.

*SARS-CoV-1 Infektionen wurden seit 2004 nicht mehr gemeldet (Lit. [5]).

Die Abbildungen 1, 2, 3 und 4 zeigen Beispiele für positive und negative real time RT-PCR-Ergebnisse:

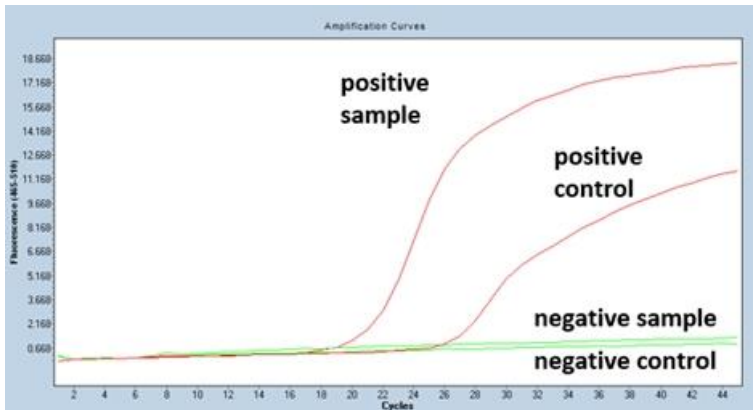


Abbildung 1: Die positive Probe zeigt eine pathogen-spezifische Amplifikation im FAM-Kanal (positive Probe und Positivkontrolle), wohingegen kein Fluoreszenzsignal in der Negativkontrolle gemessen wird (LC480 II real time PCR-Gerät).

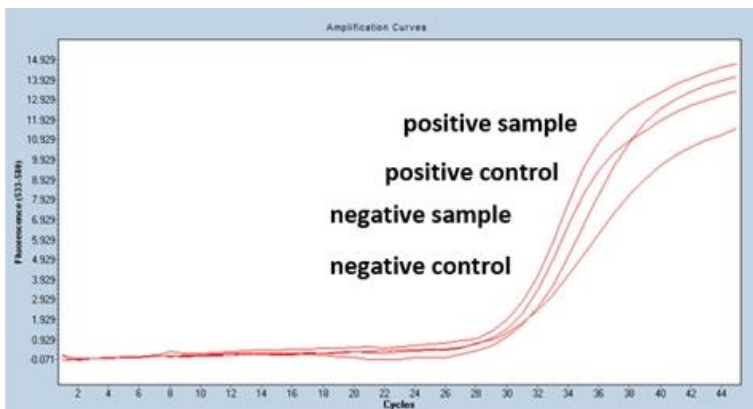


Abbildung 2: Die Positive Probe, die Positivkontrolle, die Negativkontrolle und die negative Probe zeigen ein Signal im kontroll-RNA-spezifischen HEX-Kanal (IPC). Das Amplifikationssignal der Kontroll-RNA in der negativen Probe zeigt, dass das fehlende Signal im pathogen-spezifischen FAM-Kanal nicht auf einer Inhibition der RT-PCR oder Fehler in der RNA-Isolierung beruht, sondern dass die Probe eine echte Negativprobe ist (LC480 II real time PCR-Gerät).

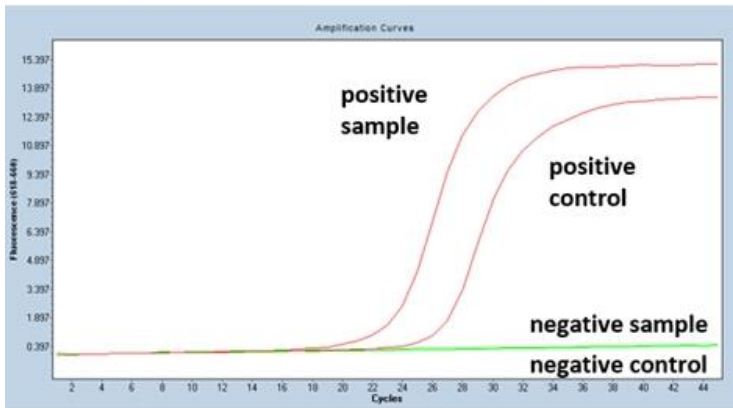


Abbildung 3: Die positive Probe zeigt eine pathogen-spezifische Amplifikation im Cy5-Kanal (positive Probe und Positivkontrolle), wohingegen kein Fluoreszenzsignal in der negativen Probe und der Negativkontrolle detektiert wird (LC480 II real time PCR-Gerät).

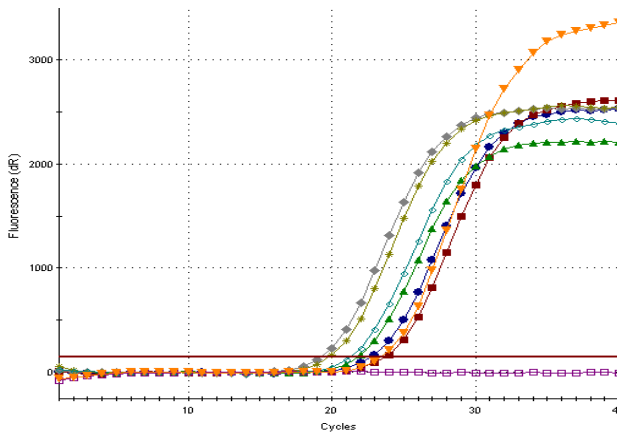


Abbildung 4: Amplifikationssignale der ISC im ROX-Kanal. Die Abbildung zeigt die C_T -Werte von Eluaten **nasopharyngealer Abstriche** nach Nukleinsäure-Extraktion mit dem NukEx Mag RNA/DNA Nukleinsäure-Extraktionskit (Stratagene Mx3005 P real time PCR-Gerät).

13. Validierung des Assays

Zur Erhöhung der Prozesssicherheit ist die IPC in der Negativ- und Positivkontrolle miteingeschlossen.

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle sollte keinen C_T -Wert im FAM- und Cy5-Kanal zeigen und der HEX-Kanal (IPC) in der Negativkontrolle sollte einen C_T -Wert von unter 34 aufweisen. Aufgrund der hohen Sensitivität des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 kann ein schwach-positives Signal im ROX-Kanal (ISC), verursacht durch eine minimale Kontamination mit humaner DNA während des Ansetzens der RT-PCR, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies hat keine Auswirkung auf die Richtigkeit des betreffenden Laufs (s. auch unten den Abschnitt „Interne Kontrollen“).

Positivkontrolle

Alle Positivkontrollen müssen eine positive (d.h. exponentielle) Amplifikationskurve jeweils im FAM-, Cy5-, ROX- und Hex-Kanal aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen C_T -Wert von 30 fallen, mit Ausnahme des Hex-Kanals, der einen C_T -Wert unter 34 zeigen muss. Die Positivkontrolle beinhaltet *In vitro*-Transkripte und synthetische DNA mit ca. 10^4 Kopien pro Reaktionen bezogen auf das RdRP-Gen, das E-Gen und die ISC.

Interne Kontrollen

Die folgenden Werte für die Amplifikation der internen Kontrollen sind gültig, sofern die **gerbion** Nukleinsäure-Extraktionskits NukEx Mag RNA/DNA, NukEx Pure RNA/DNA oder NukEx Mag respira verwendet werden. Alle internen Kontrollen (ISC und IPC, seqc – *sample and extraction quality control* = Qualitätskontrolle für Probe und Extraktion) müssen eine positive (d.h. exponentielle) Amplifikationskurve aufweisen. Die Kontroll-RNA (IPC) muss unterhalb eines C_T -Werts von 34 fallen. Ein C_T -Wert der Kontroll-RNA von über 34 ist ein Hinweis auf ein Reinheitsproblem oder eine stark positive Probe, welche die IPC inhibieren kann. Im letzteren Fall ist der Assay gültig. Es wird empfohlen, für jeden Lauf die Extraktion einer Wasserkontrolle durchzuführen. Die IPC in der Wasserkontrolle muss unterhalb eines C_T -Werts von 34 liegen. Für akkurat durchgeführte respiratorische Abstriche zeigt die ISC C_T -Werte von ca. 15 bis ca. 28. Ein stark verzögertes Signal mit einem höheren C_T -Wert als 35 zeigt eine geringe Probenmenge an. In diesem Fall können falsch-negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Liegt weder im FAM- noch im Cy5-Kanal eine Amplifikation vor, muss eine Amplifikationskurve im ROX-Kanal (IPC) und im HEX-Kanal (ISC) auftreten, wenn Primärproben von verschiedenen Arten wie z.B. Säugetiere und Vögel verwendet werden.

Werden andere Nukleinsäure-Extraktionskits verwendet, müssen eigene Grenzwerte (*Cut-Offs*) definiert werden. In diesem Fall sollte der C_T -Wert der Kontroll-RNA (IPC) aus dem Proben-Eluat, verglichen mit dem Eluat einer extrahierten Wasserkontrolle, nicht mehr als um 4 C_T verschoben sein.

14. Grenzen der Methode

- Eine strikte Beachtung der Gebrauchsinformation ist für optimale Ergebnisse unerlässlich.
- Die Verwendung dieses Produkts sollte ausschließlich auf Personal beschränkt sein, das speziell in die Technik der real time PCR sowie von *In-vitro*-Diagnoseverfahren eingewiesen und dafür geschult wurde.
- Die Richtlinien der Good Laboratory Practice (GLP) sind einzuhalten, um die ordnungsgemäße Ausführung des Assays zu gewährleisten.
- Alle Reagenzien sollten engmaschig auf Verunreinigungen und Kontaminationen überwacht werden. Im Zweifelsfall Reagenzien verwerfen.
- Dieser Assay darf nicht direkt mit einer biologischen Probe durchgeführt werden. Geeignete Nukleinsäure-Extraktionsmethoden müssen vor dem Gebrauch dieses Assays angewendet werden.
- Die Anwesenheit von RT-PCR-Inhibitoren kann falsch-negative oder ungültige Ergebnisse hervorrufen.
- Potentielle Mutationen innerhalb der Zielregionen in den SARS-CoV-2- und Sarbecovirus-Genomen, welche durch die in diesem Kit verwendeten Primer und/oder Sonden abgedeckt werden, können zu einem Fehler beim Nachweis der jeweiligen RNA führen.
- Wie bei jedem Diagnostik-Test sind die Testergebnisse des *virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0* immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild und anderen Laborergebnissen zu interpretieren.

15. Fehlerbehebung

Die folgende Anleitung zur Fehlerbehebung soll bei eventuell auftretenden Problemen mit der real time RT-PCR behilflich sein. Weitere Fragen können den Wissenschaftlern unter info@gerbion.com gestellt werden.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM-oder Cy5-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte Kanal entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen.	Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der SARS-CoV-2-spezifischen Amplifikation, den Cy5-Kanal für die Analyse der sarbecovirus-spezifischen Amplifikation, den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA und den ROX-Kanal für die Amplifikation der ISC.
Fehlerhaftes Ansetzen des Master-Mixes.	Sicherstellen, dass das Enzym zum Master-Mix hinzugefügt wurde (s. Kapitel 11, „Real time RT-PCR“).
Fehlerhafte Konfiguration der real time RT-PCR.	Arbeitsschritte überprüfen. Mit den Arbeitsschritten im Abschnitt 11.2, „Durchführung“ auf der Seite 7 f. vergleichen.
Die Programmierung des Temperaturprofils ist nicht korrekt.	Das Temperaturprofil mit dem Protokoll unter Abschnitt 11.3, „Geräte-Einstellungen“ auf Seite 9 f. vergleichen.

Keine korrekten Lagerbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten oder Haltbarkeit des Kits überschritten.	Lagerbedingungen und das aufgedruckte Verfallsdatum auf dem Kit-Etikett überprüfen. Falls nötig, einen neuen Kit verwenden und sicherstellen, dass die Kit-Komponenten wie im Kapitel 6, „Transport, Lagerung und Stabilität“ (s. Seite 5) beschrieben gelagert werden.
---	---

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM- und/oder Cy5-Kanal.

Die real time RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein	Real time RT-PCR-Bedingungen (s. Seite 7 ff.) überprüfen.
---	---

real time PCR Inhibition	Sicherstellen, dass eine geeignete Extraktionsmethode verwendet wird (s. Kapitel „Probenvorbereitung“, Seite 6) und Herstellerangaben beachten. Sicherstellen, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden.
--------------------------	---

Probenmaterial nicht ausreichend	Sicherstellen, dass für die Extraktion genug Probenmaterial verwendet wurde. Eine geeignete Extraktionsmethode verwenden (s. Kapitel 9, „Probenvorbereitung“) und den Angaben des Herstellers folgen.
----------------------------------	---

Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses	Wird die Kontroll-RNA vor der Extraktion zugegeben, deutet das Ausbleiben eines Amplifikationssignals auf eine fehlerhafte Extraktion hin. Sicherstellen, dass eine geeignete Extraktionsmethode (kommerzielle Kits werden empfohlen) verwendet wird. An das Herstellerprotokoll halten.
--	--

Keine korrekten Lagerbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten oder Haltbarkeit des Kits überschritten.	Lagerbedingungen und das aufgedruckte Verfallsdatum auf dem Kit-Etikett überprüfen. Falls nötig, einen neuen Kit verwenden und sicherstellen, dass die Kit-Komponenten wie im Kapitel 6 „Transport, Lagerung und Stabilität“ (s. Seite 5) beschrieben gelagert werden.
---	--

Detektion eines Fluoreszenz-Signals im FAM- und/oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle

Kontamination beim Ansetzen der real time RT-PCR	Real time RT-PCR in Replikaten wiederholen. Falls das Ergebnis in der Wiederholung negativ sein sollte, ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Sicherstellen, dass die Positivkontrolle zuletzt pipettiert wird und die Reaktionsgefäße sofort nach Zugabe der jeweiligen Probe verschließen. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM- oder Cy5-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kit-Komponenten kontaminiert sind. Sicherstellen, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Real time RT-PCR mit einem neuen Kit wiederholen.
--	--

Detektion eines Fluoreszenz-Signals im ROX-Kanal der Negativkontrolle

Kontamination mit humaner DNA beim Ansetzen der real time RT-PCR

Sofern der ROX-Kanal sehr hohe C_T -Werte zeigt, kann die Kontamination vernachlässigt werden.

Sind der FAM- und der Cy5-Kanal in der Negativkontrolle negativ, behält der PCR-Lauf seine Gültigkeit in Bezug auf den Nachweis von SARS-CoV-2

16. Leistungsfähigkeit des Tests

16.1. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (*limit of detection* = LoD) des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 wurde durch eine serielle Verdünnung synthetischer RNA-Fragmente, die die RdRP- und E-Gen-Zielsequenz enthielten, im Stratagene Mx3005 real time PCR-Gerät bestimmt. Die Nachweisgrenze (LoD) des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 liegt bei ≤ 10 Genom-Kopien pro Reaktion.

16.2. Analytische Spezifität

Die Spezifität des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 wurde mit verschiedenen anderen relevanten Viren und Bakterien, die in klinischen Proben gefunden werden, und basierend auf *In silico*-Analysen evaluiert.

Ergebnisse:

Der virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit 2.0 zeigte ein positives Ergebnis bei Proben, die SARS-CoV-2- und Sarbecovirus-RNA-Sequenzen enthielten, wohingegen Proben, die andere Pathogene enthielten, zuverlässig negativ getestet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Eluierte DNA und RNA bakterieller und viraler Pathogene, die für die Bestimmung der analytischen Spezifität des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 getestet wurden:

Eluate mit bekanntem Status	Erwartete Ergebnisse E-Gen Cy5-Kanal	Erwartete Ergebnisse RdRP-Gen/ S-Gen FAM-Kanal	virellaSARS-CoV-2 seqc E-Gen Cy5-Kanal	virellaSARS-CoV-2 seqc RdRP-Gen/ S-Gen FAM-Kanal
SARS-CoV-2	positiv	positiv	positiv	positiv
SARS-CoV-1	positiv	negativ	positiv	negativ
MERS-CoV	negativ	negativ	negativ	negativ
HCoV-229E	negativ	negativ	negativ	negativ
HCoV-OC43	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenza A H3N2	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenza A H5N1	negativ	negativ	negativ	negativ
Influenzavirus B	negativ	negativ	negativ	negativ
Respiratorisches Synzytial-Virus A	negativ	negativ	negativ	negativ
Respiratorisches Synzytial-Virus B	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenzavirus 1	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenzavirus 2	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenzavirus 3	negativ	negativ	negativ	negativ
Parainfluenzavirus 4	negativ	negativ	negativ	negativ
Metapneumovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Adenovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Rhinovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Enterovirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Humanes Bocavirus	negativ	negativ	negativ	negativ
Legionella pneumoniae	negativ	negativ	negativ	negativ
Mycoplasma pneumoniae	negativ	negativ	negativ	negativ
Mycobacterium tuberculosis complex	negativ	negativ	negativ	negativ
Bordetella pertussis	negativ	negativ	negativ	negativ
Bordetella parapertussis	negativ	negativ	negativ	negativ
S. aureus	negativ	negativ	negativ	negativ
MRSA	negativ	negativ	negativ	negativ
MSSA	negativ	negativ	negativ	negativ
Streptococcus spp.	negativ	negativ	negativ	negativ

16.3. Klinische Proben

Bestätigte positive (50) und negative (153) Proben (orale und nasale Abstriche) des pandemischen Ausbruches von 2020 in Europa wurden getestet. Die RNA wurde mithilfe des NukEx Mag RNA/DNA (**gerbion** Best.-Nr. G05012) Extraktionskits auf einem KingFisher Prime Duo-Gerät extrahiert. Die Extraktionen wurden mithilfe des NukEx Mag respira (**gerbion** Best.-Nr. G05026) Extraktionskits auf einem KingFisher Prime Duo-Gerät wiederholt. Die Ergebnisse beider Extraktionen waren identisch.

Die PCR-Experimente wurden auf einem MX3005p Stratagene PCR-Gerät durchgeführt. Die Testung bestätigter Proben mit dem virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kit zeigte eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 100 %. Bei keiner der Proben fand während der PCR eine Inhibition statt. Für die Validierung des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 wurden die Eluate aller Proben erneut getestet und zeigten die gleichen Ergebnisse.

	Positive Proben	Negative Proben
Positiv mit virellaSARS-CoV-2 seqc	50	0
Negativ mit virellaSARS-CoV-2 seqc	0	153
	Sensitivität	Spezifität
	100 %	100 %

16.4. Linearer Messbereich

Der lineare Messbereich des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 wurde durch die Analyse einer logarithmischen Verdünnungsreihe von *In vitro*-Transkripten und synthetischen DNA-Fragmenten evaluiert.

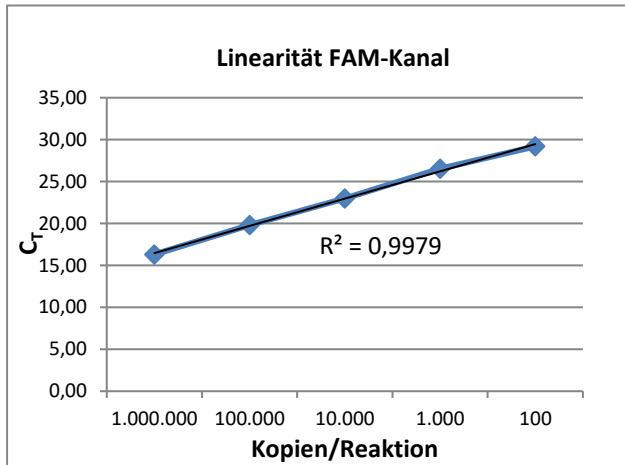


Abbildung 5: Bestimmung des linearen Messbereichs des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 im FAM-Kanal.

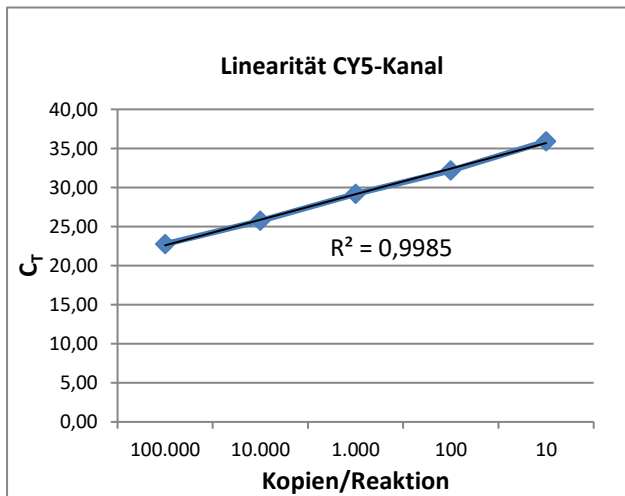


Abbildung 6: Bestimmung des linearen Messbereichs des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 im Cy5-Kanal.

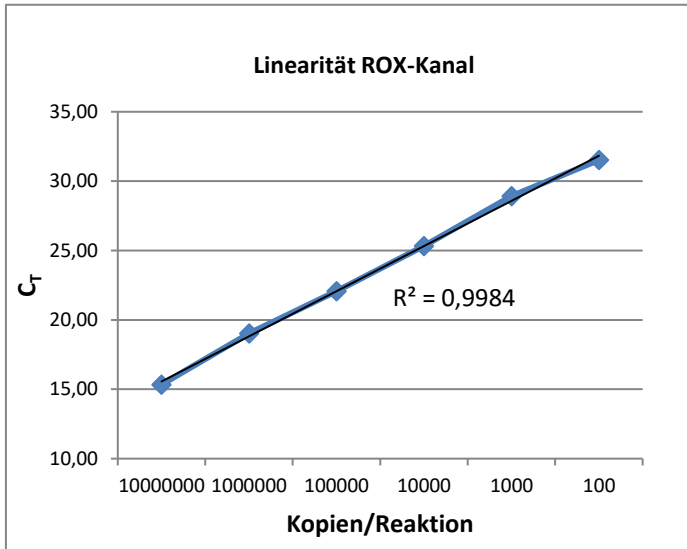


Abbildung 7: Bestimmung des linearen Messbereichs des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 im ROX-Kanal.

16.5. Präzision

Die Präzision des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits 2.0 wurde als Intra-Assay-Variabilität, Inter-Assay-Variabilität und als Inter-Chargen-Variabilität bestimmt.

Variabilitätsdaten werden durch Standardabweichungen und Variationskoeffizienten angegeben. Die Daten basieren auf Quantifizierungsanalysen definierter Konzentrationen von *in-vitro* RdRP- und E-Gen-Transskripten, ISC-spezifischer DNA und auf dem Schwellenwert-Zyklus der Kontroll-RNA (IPC).

Tabelle 8: Präzision des virellaSARS-CoV-2 seqc real time RT-PCR-Kits.






RdRP-Gen und S-Gen (FAM)	Kopien/ μ l	Standard-abweichung	Variations-koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0.23	0.77
Inter-Assay-Variabilität	25	0.51	1.71
Inter-Chargen-Variabilität	25	0.76	2.56
E-Gen (Cy5)	Kopien/ μ l	Standard-abweichung	Variations-koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0.27	0.84
Inter-Assay-Variabilität	25	0.51	1.50
Inter-Chargen-Variabilität	25	0.52	1.61
ISC (ROX)	Kopien/ μ l	Standard-abweichung	Variations-koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0.28	0.90
Inter-Assay-Variabilität	25	0.40	1.27
Inter-Chargen-Variabilität	25	0.25	0.77
IPC (HEX)	Kopien/ μ l	Standard-abweichung	Variations-koeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität	25	0.69	2.31
Inter-Assay-Variabilität	25	0.58	1.91
Inter-Chargen-Variabilität	25	0.37	1.22

16.6. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität von real time (RT-) PCR-Assays hängt hauptsächlich von der verwendeten DNA/RNA-Extraktionsmethode ab, mit deren Hilfe die Nukleinsäuren von verschiedenen biologischen Proben isoliert wurden. DNA/RNA-Extraktionsreagenzien sind nicht Bestandteil von **gerbion** real time (RT-) PCR-Kits. **gerbion** real time (RT-) PCR-Kits beinhalten eine Extraktionskontrolle und Richtlinien für die Validierungskriterien der Extraktionskontrolle in jeder Reaktion. Die Extraktionskontrolle zeigt eine Inhibition der real time (RT-) PCR und/oder eine ineffiziente Nukleinsäure-Extraktion an. Sie kann nicht als Kalibrator verwendet werden.

Daher garantiert **gerbion** die analytische Sensitivität und Spezifität der real time (RT-) PCR-Kits, durchgeführt mit eluierter DNA und RNA aus Referenzmaterial und Ringversuchsproben sowie mit synthetischen Nukleinsäurefragmenten. **gerbion** garantiert keine diagnostische Sensitivität. Falls diagnostische Sensitivitäten in den Gebrauchsanleitungen von **gerbion** real time (RT-) PCR-Kits erwähnt werden, korrelieren die Daten streng mit einer spezifischen Nukleinsäure-Extraktionsmethode, die bei der Validierung des jeweiligen Kits angewandt wurde und die nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragen werden kann. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Extraktionsmethode, die für die DNA/RNA-Isolierung aus biologischen Proben angewandt wird, zu qualifizieren.

17. Abkürzungen und Symbole

RNA	Ribonucleic Acid		Obere Temperaturgrenze
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction		Hersteller
REACTION MIX	Reaktionsmix		Verwenden bis JJJ-MM-TT
ENZYME	Enzyme	LOT	Chargennummer
CONTROL +	Positivkontrolle	CONT	Inhalt
CONTROL -	Negativkontrolle		Anleitung beachten
CONTROL RNA IPC	Kontroll-RNA (IPC)	IVD	<i>In vitro</i> -Diagnostikum
REF	Bestellnummer	CE	Europäische Konformität
	Inhalt ausreichend für <n> Tests		

18. Literatur

- [1] www.who.int/health-topics/coronavirus
- [2] Corman et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real time RT-PCR. Eurosurveillance, Volume 25, Issue 3, 23/Jan/2020.
- [3] www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z, 02/March/2020
- [4] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/coronavirus/>
- [5] <https://www.nhs.uk/conditions/sars/>


Vertrieb durch:




Hauptstraße 54

D – 64560 Riedstadt

WEB: www.AlphaScience.de

 06158-74 804-0

 06158-74 804-22

 customerservice@alphascience.de