



Deutsch

REF LMC403

## Loopamp™ SARS-CoV-2 Detection Kit

### VERWENDUNGSZWECK

Das Loopamp™ SARS-CoV-2 Detection Kit ist ein qualitativer *In-vitro*-Diagnostest für den Nachweis von Nukleinsäuren aus SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal- und Oropharyngealabstrichen sowie Speichelproben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen, die auf COVID-19 hindeuten (z. B. Fieber und/oder Symptome einer akuten Atemwegserkrankung).

Die Ergebnisse dienen dem Nachweis von SARS-CoV-2-RNA, die bei einer Infektion in Nasopharyngeal- bzw. Oropharyngealabstrichen und Speichelproben nachweisbar ist. Positive Testergebnisse sind ein Indikator für den Nachweis von SARS-CoV-2-RNA, bedeuten aber nicht zwingend das Vorhandensein eines übertragbaren Virus.

Negative Testergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Entscheidungsgrundlage für das Patientenmanagement herangezogen werden. Negative Testergebnisse müssen mit einer ärztlichen Untersuchung, Patientenanamnese und epidemiologischen Informationen verbunden werden.

### TESTGRUNDLAGEN

Dieses Produkt basiert auf dem von der Eiken Chemical Co., Ltd. entwickelten Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren „Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP).

Die LAMP-Methode weist folgende Merkmale auf: (1) Es ist nur ein Enzym erforderlich und die Amplifikationsreaktion findet unter isothermen Bedingungen statt.<sup>1), 2)</sup> (2) Aufgrund der Verwendung von vier Primern, die sechs verschiedene Regionen auf der Ziel-DNA erkennen, hat sie eine extrem hohe Spezifität. (3) Sie hat eine hohe Amplifikationseffizienz und ermöglicht eine Amplifikation innerhalb kurzer Zeit. (4) Sie erzeugt große Mengen des Amplifikats für einen einfachen optischen Nachweis.<sup>3), 4)</sup>

Die mit diesem Produkt mitgelieferten Primer sind auf das N- und das RdRp-Gen der SARS-CoV-2-RNA ausgerichtet. Diese Genregion wurde in ausgewählten Nukleinsäuresequenzen des SARS-CoV-2 mittels Alignment-Analyse als gut konserviert nachgewiesen.

RNA aus klinischen Proben, Nasopharyngeal-, Oropharyngealabstrichen und Speichelproben wird mittels Loopamp™ Viral RNA Extraction Kit oder QIAamp Viral RNA Mini Kit von QIAGEN (separat erhältlich) extrahiert.

Probenlösung und Primer-Mix 2019-nCoV (PM nCV19) mit SARS-CoV-2-spezifischen Primern werden anschließend zur RNA-Amplifikation in ein Reaktionsröhrchen dispensiert und mit dem getrockneten Reagenz vermischt. Da Reverse Transkriptase, strangversetzende DNA-Polymerase, Deoxynukleotid-Triphosphat und Calcein in getrockneter Form in der Verschlusskappe des Reaktionsröhrchens (innerhalb der Rippe) gelagert werden, werden sie in der genannten Mix-Lösung (Probenlösung, Primer-Mix 2019-nCoV (PM nCV19)) diluiert und bei 62,5 °C inkubiert. cDNA wird durch Reverse Transkriptase basierend auf genomischer SARS-CoV-2-RNA in der Probenlösung synthetisiert. Ausgehend von dieser cDNA erlaubt die strangversetzende DNA-Polymerase eine LAMP-Reaktion.

Der Amplifikatnachweis basiert auf der Trübungsmessung eines Nebenprodukts: Magnesiumpyrophosphat (ein weißes Präzipitat).<sup>(3)</sup> Anstelle der Trübungsmessung ist auch die optische Beurteilung unter UV-Bestrahlung möglich. Während der Amplifikation wird das im getrockneten LAMP-Reagenz enthaltene Calcein freigesetzt, wobei für das bloße Auge sichtbares Fluoreszenzlicht erzeugt wird.<sup>(4)</sup> Vor der Reaktion befindet sich das Calcein aufgrund der daran gebundenen Manganionen im gequollenen Zustand. Sobald jedoch die LAMP-Reaktion beginnt, bilden sich Pyrophosphationen, die mit den Manganionen komplexieren, und das Calcein fluoresziert.<sup>(4)</sup>

### INHALT DES KITS

Reagenzien sind bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, sofern der ungeöffnete Behälter bei 2–8 °C gelagert wird.

- Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz ..... 1 × 48 Röhrchen
- Bst** DNA-Polymerase (**Bst** DNA pol) \*<sup>1</sup>
- Reverse Transkriptase (RT) \*<sup>2</sup>
- Deoxynukleotid-Triphosphate
- Magnesiumsulfat
- Calcein
- Manganchlorid
- Primer-Mix 2019-nCoV (PM nCV19) \*<sup>3</sup> ..... 1 × 0,72 ml
- Positivkontrolle 2019-nCoV (PC nCV19) \*<sup>4</sup> ..... 1 × 0,16 ml
- Negativkontrolle (NC)..... 1 × 0,16 ml
- \* 1: **Bst** DNA pol ist eine strangversetzende DNA-Polymerase ohne 5'→3'-Exonukleaseaktivität, abgeleitet von **Bacillus stearothermophilus**.
- \* 2: Reverse Transkriptase ist von Avian Myeloblastosis Virus abgeleitet.
- \* 3: Primer sind synthetisierte, HPLC-gereinigte Oligonukleotide, die auf das N-Gen und RNA-abhängige RNA-Polymerase-Gen (RdRp) von genomischer SARS-CoV-2-RNA ausgerichtet sind.
- \* 4: PC nCV19 enthält mittels Restriktionsenzymbehandlung *in vitro* transkribierte RNA aus künstlich synthetisierter Plasmid-DNA mit SARS-CoV-2 N- oder RdRp-Genen.

Die Namensabkürzungen der folgenden Reagenzien, die Chargennummer sowie der Hersteller (EKN) sind wie folgt auf den Behältern aufgedruckt:

Reagenzien	Kennzeichnung am Röhrchen	Code am Verschluss
Primer-Mix 2019-nCoV	PM nCV19 Chargenr. EKN	PM nCV19
Positivkontrolle 2019-nCoV	PC nCV19 Chargenr. EKN	PC nCV19
Negativkontrolle	NC Lot No., EKN	NC

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur für den Einsatz als *In-vitro*-Diagnostikum vorgesehen.
- (2) Dieses Produkt ist für die klinische Diagnose von SARS-COV-2 anhand klinischer Proben menschlichen Ursprungs vorgesehen. Nicht für andere Zwecke verwenden.
- (3) Bei Verwendung dieses Produkts immer die Serviceanleitung beachten.
- (4) Reagenzien nicht einfrieren.
- (5) Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden.
- (6) Verschiedene Chargen nicht mischen.
- (7) Reagenzien nicht nachfüllen.
- (8) Die Leistung des Loopamp™ SARS-CoV-2 Detection Kit ist abhängig vom Know-how des Bedieners und der Einhaltung der Verfahrensanweisungen. Alle Tests sollten nur von fachlich geschultem Personal durchgeführt werden.
- (9) Kurz vor Verwendung die erforderliche Anzahl Reaktionsröhrchen aus der Verpackung entnehmen und den Aluminiumbeutel sofort fest verschließen.
- (10) Trockenmittel im Aluminiumbeutel belassen. Hohe Feuchtigkeit kann das Getrocknete RNA-Amplifikationsreagenz in den Reaktionsröhrchen zersetzen.
- (11) Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz kann sich durch Wärme- und Lichteinwirkung verändern. Nur die erforderliche Anzahl Reaktionsröhrchen (Anzahl Proben + Anzahl Kontrollen) entnehmen und unbenutzte Röhrchen sofort verschließen.
- (12) Vor der Verwendung des Inkubators die Gebrauchsanweisung des betreffenden Geräts lesen.
- (13) Klinische Proben stellen ein potenzielles Infektionsrisiko dar. Alle notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Biogefährdung treffen.
- (14) PM nCV19, PC nCV19 und NC enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid wird als giftig eingestuft. Kontakt mit Augen, Mund oder Haut vermeiden.
- (15) Bei versehentlichem Kontakt von Reagenzien mit Augen, Mund oder Haut die betroffene Stelle sofort mit reichlich Wasser abspülen und, falls notwendig, einen Arzt konsultieren.
- (16) PC nCV19 nicht diluieren oder den Proben beifügen. Zur Vermeidung einer RNA-Kontamination PC nCV19 nur gemäß der Beschreibung in dieser Serviceanleitung verwenden.
- (17) PC nCV19 und alle positiven klinischen Proben getrennt von den anderen Kit-Reagenzien aufbewahren.

- (18) Die Verschlusskappe jedes Reaktionsröhrchens enthält Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz. Verschlussinnenseite nicht berühren.
- (19) Reaktionsröhrchen vor Verwendung sorgfältig auf Risse oder Kratzer überprüfen. Beschädigte Röhrchen können falsche Ergebnisse liefern und zur Kontamination von Inkubator und Arbeitsbereich führen.
- (20) Reaktionsröhrchen vor Ende der LAMP-Reaktion keinem UV-Licht aussetzen. Längere UV-Lichtbestrahlung kann die Röhrchen beschädigen und zu falschen Ergebnissen führen.
- (21) Bei Verwendung von UV-Licht für die optische Fluoreszenzbeurteilung nicht direkt in die UV-Lichtquelle schauen. Schon ein kurzer Blick in das UV-Licht kann die Augen reizen und konjunktivitisähnliche Symptome hervorrufen. Bei direktem Blickkontakt mit dem UV-Licht sollte eine Glasscheibe verwendet oder eine Schutzbrille bzw. Augenmaske getragen werden.
- (22) Siehe Handbuch des Thermal Cycler in medizinischer Qualität mit einer Temperaturgenauigkeit von  $\pm 0.5$  °C. Bei Verwendung von Real-Time Turbidimeter LA-500 das Reaktionsröhrchen vorsichtig aus dem Amplifikationsgerät entnehmen, um Verbrennungen zu vermeiden.

### ABFALLENTSORGUNG

- (1) Röhrchen nicht nach der RNA-Amplifikation öffnen. Verschlusskappe geschlossen halten und benutzte Röhrchen als medizinische Abfälle mittels Verbrennung oder doppelt verpackt in verschließbaren Plastikbeuteln entsorgen.
- (2) Reaktionsröhrchen niemals autoklavieren oder wiederverwenden, anderenfalls werden Amplifikate dispergieren und zu Kontamination führen.
- (3) Reaktionsröhrchen bestehen hauptsächlich aus PP; Reaktionsröhrchen-Haltevorrichtung aus PET; Aluminiumbeutel aus Aluminium; Kit-Behälter aus Papier.
- (4) Gebrauchte Reagenzien, Behälter oder Laborutensilien gemäß lokalen Vorschriften entsorgen.

### PROBENAHEME

Nasopharyngeal-, Oropharyngealabstriche und Speichelprobe

- (1) Informationen zu Entnahme und Transport von Patientenproben sind der WHO Interim Guidance „Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases“ vom 19. März 2020 und darüber hinaus zu entnehmen.
- (2) Die entnommenen Proben sollten umgehend verwendet werden.
- (3) **Während der Probenahme gebildete Aerosole können die Dispersion von Virus oder Virus-RNA in die Testumgebung zur Folge haben und Kontamination verursachen. Deshalb sollte die Probenahme nicht im gleichen Raum erfolgen, in dem dieses Produkt verwendet wird.**

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, NICHT IM KIT ENTHALTEN

- 1) Abstrichtupfer: FLOQ Swabs (mit Röhrchen) von Copan Italia S.p.A. oder gleichwertig
  - 2) Reagenzien zur RNA-Extraktion: QIAamp Viral RNA Mini Kit von QIAGEN, oder Reagenzien zur Nukleinsäure-Extraktion mit gleichwertiger Leistung
  - 3) Mikrozentrifuge (mit 2-ml-Rotor, 20.000  $\times$  g) <sup>\*5</sup>
  - 4) 1,5-ml-Adsorptionsröhrchen <sup>\*5</sup> mit Nukleinsäure zur Extraktgewinnung
  - 5) Pipette (0,5–10  $\mu$ l, 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l) <sup>\*5</sup> und Spitze mit Filter
  - 6) Ethanol (96–100 %) <sup>\*5</sup>
  - 7) Kühlgestelle aus Aluminium und Eis (zerstoßenes Eis) oder gleichwertig
  - 8) Tischzentrifuge
  - 9) Einfache Zentrifuge für Mikrozentrifugenröhrchen, 8er-Streifen
  - 10) Echtzeit-Turbidimeter (speziell für LAMP-Methode, Wellenlänge: 600–700 nm, Amplifikationstemperatur: 62,5 °C)
  - 11) Vortex Mixer <sup>\*5</sup>
  - 12) Loopamp™ Viral RNA Extraction Kit
- \* 5: Verwendet für QIAamp Viral RNA Mini Kit. Bei Verwendung anderer Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion sollten Reagenzien, Laborgeräte etc. gemäß den entsprechenden Serviceanleitungen präpariert und verwendet werden. Darüber hinaus sind die darin beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen für Verwendung und Umgang zu beachten.

### Für optischen Fluoreszenznachweis

- Inkubator (Temperaturgenauigkeit:  $\pm 0,5$  °C; mit beheizbarem Deckel)
- Thermoblock
- UV-Licht (Wellenlänge: 240 - 260 nm, und 350 - 370 nm)
- Schutzbrille und Augenmaske

### Für Echtzeit-Trübungsmessung

- Real-Time Turbidimeter LA-500
- Zentrifuge für Mikrozentrifugenröhrchen, 8er-Streifen

### REAGENZVORBEREITUNG

- 1) Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz
  - (1) Im Kühlschrank (2–8 °C) gelagertes Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz 5 Minuten bei Zimmertemperatur in der Aluminiumpackung lagern.
  - (2) Erforderliche Menge (Anzahl Proben + 2) Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz entnehmen und auf Eis lagern. Die restlichen Reagenzien umgehend in Original-Aluminiumpackung fest verschließen und in den Kühlschrank (2–8 °C) legen.
- 2) PM nCV19  
Vor Verwendung abzentrifugieren.
- 3) PC nCV19  
Vor Verwendung abzentrifugieren. Messung sollte einmal täglich erfolgen.
- 4) NC  
Vor Verwendung abzentrifugieren. Messungen sollten bei jeder Verwendung erfolgen.

### MESSVERFAHREN

#### RNA-Extraktion

#### Vorbereitung der Probenlösung (Vorbereitung der RNA-Extraktion)

Mittels Loopamp™ Viral RNA Extraction Kit oder QIAamp Viral RNA Mini Kit etc. extrahierte RNA-Lösung wird als Probenlösung verwendet.

#### Reagenzien- und Probenmischung (auf Eis)

- (1) Inkubator oder Real-Time Turbidimeter LA-500 einschalten.
- (2) 15  $\mu$ l von PM nCV19 in Reaktionsröhrchen pipettieren.
- (3) 10  $\mu$ l der Probenlösung dispensieren (Gesamtmenge: 25  $\mu$ l) und Röhrchen verschließen.
- (4) 10  $\mu$ l von NC anstelle der Probenlösung dispensieren und Röhrchen verschließen.
- (5) 10  $\mu$ l von PC nCV19 anstelle der Probenlösung dispensieren und Röhrchen verschließen.
- (6) Abzentrifugieren und anhand der unteren der beiden Linien an den Reaktionsröhrchen sicherstellen, dass alle Lösungen hinzugefügt wurden.
- (7) Die getrockneten Reagenzien durch Umdrehen der Reaktionsröhrchen und Sammeln der Lösungen in der Verschlusskappe rekonstituieren. Zur Rekonstitution der getrockneten Reagenzien die Röhrchen 2 Minuten verkehrt herum lagern.
- (8) Zum Mischen des Inhalts die Röhrchen 5 Mal drehen. Vollständige Dilution der getrockneten Reagenzien in der Verschlusskappe prüfen.
- (9) Reaktionsröhrchen in der Zentrifuge abzentrifugieren.

#### Amplifikation

##### A. Echtzeit-Trübungsmessung (Standardverfahren)

- (1) Real-Time Turbidimeter LA-500 für den Nachweis mit diesem Produkt konfigurieren.
- (2) Prüfen, ob die angezeigte Temperatur 62,5 °C erreicht (Turbidimeter sollte vor Gebrauch 20 Minuten vorgeheizt werden).
- (3) Reaktionsröhrchen laden und Messung starten.
- (4) Turbidimeter-Anzeige auf einen Trübungsanstieg der Positiv- und Negativkontrollen prüfen. Bei einem Anstieg der Trübung in PC nCV19, jedoch nicht in NC, verläuft die Amplifikationsreaktion ordnungsgemäß (Abb. 1). Bei anderen Bedingungen verläuft die Amplifikationsreaktion möglicherweise nicht ordnungsgemäß. In diesem Fall sollten die betroffenen Proben der Reagenzvorbereitung erneut getestet werden.
- (5) Fertigstellung der Polymerase-Inaktivierung bestätigen (wird vom Turbidimeter automatisch abgeschlossen). Alle Reaktionsröhrchen aus der Real-Time Turbidimeter entnehmen und ungeöffnet entsorgen.

##### B. Inkubator und Thermal Cycler

## Für optischen Fluoreszenznachweis

- (1) Temperatur des Inkubators (mit beheizbarem Deckel; Temperaturgenauigkeit:  $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) auf  $62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  stellen. Warten, bis der eingestellte Temperaturwert angezeigt wird.
- (2) Reaktionsröhrchen laden und anschließend die Amplifikationsreaktion (35 Minuten bei  $62,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) starten.
- (3) Nach 35 Minuten Polymerase mittels Thermoblock (5 Minuten bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder 2 Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) inaktivieren, um die Reaktion zu beenden.

## Amplifikationsplots

(Analyzer: Real-Time Turbidimeter LA-500)

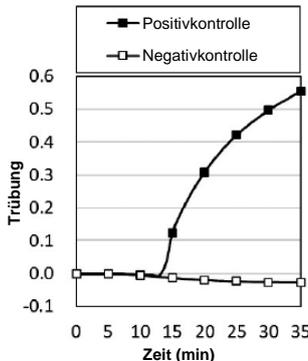


Abb. 1: Amplifikationsplots für Kontrollen

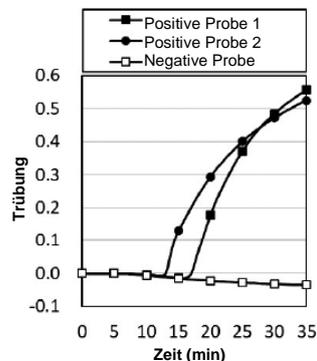


Fig 2: Amplifikationsplots für Proben

## Vorsichtsmaßnahmen bei der Messung

- (1) Die LAMP-Reaktion ist sehr sensitiv und kann bei einer Probenkontamination mit Amplifikationen im Spurenbereich fehlerhafte Ergebnisse liefern. Zur Vermeidung einer Kontamination sollte die Probenahme nicht im gleichen Raum, in dem das Reagenz verwendet wird, durchgeführt werden oder in einem vom Testbereich abgegrenzten Bereich erfolgen. Bei Bedarf sollten zur Verhinderung von Kontaminationen Vorsichtsmaßnahmen wie beispielsweise die Verwendung von Reinraumarbeitsplätzen oder das Tragen von Schutzkitteln getroffen werden.
- (2) Das RNA-Molekül ist hochgradig instabil und muss deshalb mit Vorsicht behandelt werden. Es ist leicht abbaubar, insbesondere durch RNA-abbauende Enzyme (RNasen). RNasen können ebenfalls durch Proben, Testgeräte, Reagenzien, Speichel oder Schweiß des Testpersonals kontaminieren und dürfen aufgrund von Wärme nicht vollständig durch Autoklavierung inaktiviert werden. DNA-abbauende Enzyme (DNasen) beeinträchtigen die Amplifikationsantwort nachweislich. Deshalb ist es wichtig, die Kontamination von RNase und DNase durch folgende Vorsichtsmaßnahmen so weit wie möglich zu verhindern.
  - Räumliche Trennung des Testtisches oder -geräts für die RNA-Testung von anderen.
  - Testpersonal sollte zur Verhinderung einer Kontamination der RNase/DNase durch Speichel und Schweiß des Laborpersonals stets Handschuhe und Masken tragen.
- (3) Blutreiche Proben sind aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung der Testergebnisse zu vermeiden.
- (4) Probenlösungen sollten grundsätzlich sofort verwendet werden. Ist eine Zwischenlagerung unumgänglich, sollten die Probenlösungen bei  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.
- (5) Nach Mischen der Probenlösung in der Reaktionslösung verbliebene Bläschen können die Trübungsmessung stören und in Folge zu einer fehlerhaften Bestimmung führen. Bläschenbildung daher unbedingt vermeiden. Bläschen durch Abzentrifugieren entfernen.
- (6) Die Rekonstitution des Getrockneten RNA-Amplifikationsreagenz sollte zuverlässig ausgeführt werden. Eine unzureichende Auflösung kann die Leistung beeinträchtigen, zum Beispiel in Form einer verringerten Sensitivität.
- (7) Das Röhrchen mit PC nCV19 und NC sollte vor Öffnen der Verschlusskappe abzentrifugiert werden. Die Verschlusskappe sollte so kurz wie möglich geöffnet bleiben.
- (8) PC nCV19 weist eine hohe Kopienzahl auf. Zur Vermeidung einer Kontamination anderer Proben die Verschlüsse aller Reaktionsröhrchen mit Ausnahme der Kontroll-Reaktionsröhrchen aufbringen und am Schluss PC nCV19 hinzufügen.
- (9) Nach Rekonstitution der Reagenzien sollten die Reagenzien schnell der Amplifikationsreaktion unterzogen werden.
- (10) Im Real-Time Turbidimeter LA-500 wird automatisch ein Enzyminaktivierungsverfahren durchgeführt.

- (11) Röhrchenverschluss niemals nach der Reaktion öffnen. Insbesondere nach Entnahme des Reaktionsröhrchens aus dem Gerät ist auf eine vorsichtige Entfernung des Röhrchenverschlusses zu achten, damit sich das Röhrchen nicht öffnet. Darüber hinaus sollte der Umgang mit Amplifikaten (z. B. Elektrophorese) vermieden werden.
- (12) Zur Vermeidung von Fehleinschätzungen sollte der optische Fluoreszenznachweis nach der Enzym-Inaktivierung (5 Minuten bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder 2 Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durchgeführt werden.
- (13) Bei Verwendung eines UV-Strahlers sollte mit einer Glasscheibe bzw. einer breiten Auswahl an Schutzbrillen oder Schuttschichten gearbeitet werden. Während der Bestrahlung nicht direkt in die UV-Lampe schauen.

## VERFAHRENSHINWEISE

- (1) Arbeitsplätze vor dem Testen mit Natriumhypochlorit  $0,5\%$  reinigen.
- (2) Bereiche für Probenahme und LAMP-Testung trennen.
- (3) Alle notwendigen Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung treffen, insbesondere Handschuhwechsel nach Probenübertragung oder bei Kontakt der Handschuhe mit der RNA-Lösung.
- (4) Zum Sammeln der Bestandteile im oberen Teil des Röhrchens die Röhrchen mit PC nCV19 vor dem Öffnen abzentrifugieren oder vorsichtig anschnippen. Röhrchen unmittelbar nach Dispension von PC nCV19 verschließen.
- (5) Reaktionsröhrchen nach Beginn oder Abschluss der LAMP-Reaktion niemals öffnen. Insbesondere ist darauf zu achten, dass die Reaktionsröhrchen beim Entladen der Reaktionsröhrchen aus dem Inkubator nicht versehentlich aufgehen.
- (6) Amplikate in den Röhrchen nicht zur Elektrophorese oder für andere Anwendungen wiederverwenden.
- (7) Bei anderen Echtzeit-Turbidimetern oder Inkubatoren ist bei einem optischen Fluoreszenznachweis vor der Beurteilung eine Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder 2 Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durchzuführen, um Fehlbeurteilungen zu vermeiden.
- (8) Bei Real-Time Turbidimeter LA-500 oder einem anderen Inkubator darf bei UV-Bestrahlung nicht direkt in das UV-Licht geschaut werden. Bei jedem direkten Blick in das UV-Licht sollte eine Glasscheibe verwendet oder eine Schutzbrille bzw. Augenmaske getragen werden.

## Für Inkubator mittels UV-Licht

Eventuelle Bläschen durch Abzentrifugieren entfernen.

## Für Real-Time Turbidimeter LA-500

Da Bläschen in der Reaktionslösung die Trübungsmessung beeinträchtigen und zu einer Fehlbeurteilung führen können, sollte Bläschenbildung beim Mischen von Reagenz und Probenlösung vermieden werden. Eventuelle Bläschen durch Abzentrifugieren entfernen.

Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz sollte vollständig diluiert werden. Nicht diluierte Bestandteile können die Leistung beeinträchtigen, z. B. in Form einer verminderten Sensitivität.

Die Polymerase-Inaktivierung wird automatisch durchgeführt.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

### Für optischen Fluoreszenznachweis

#### Für Inkubator mittels UV-Licht

Den Boden jedes Reaktionsröhrchens unter Verwendung einer Schutzbrille oder anderer Schutzkleidung von der Seite bestrahlen.

Für eine gültige Testserie müssen folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Positivkontrolle: Emission von grünem Fluoreszenzlicht.
- Negativkontrolle: Keine Emission von Fluoreszenzlicht.

Falls eine der Kontrollen ungültig ist, sollten alle Proben der Testserie als ungültig gemeldet und der Test wiederholt werden.

Nach erfolgter Bestätigung der Gültigkeit der Testserie sind die Proben wie folgt zu beurteilen:

- Positive Probe: Emission von grünem Fluoreszenzlicht.
- Negative Probe: Keine Emission von Fluoreszenzlicht.

### Für Real-Time Turbidimeter LA-500

Nach erfolgter Bestätigung des Anstiegs der Trübung in PC nCV19, jedoch nicht in NC, sind die Proben nach folgenden Kriterien zu beurteilen (Abb. 1 und 2).

- Positiv: Leichter Trübungsanstieg zu beobachten.
- Negativ: Kein Trübungsanstieg zu beobachten.

**Anmerkungen:**

- (1) Die Nachweisgrenze für dieses Produkt sind 60 Genomäquivalente pro Test. Auch bei einem negativen Test sollten sich Patienten mit einem anhaltenden, auf eine SARS-CoV-2-Infektion hindeutenden Symptom erneut ärztlich untersuchen lassen.
- (2) Obwohl Primer auf eine bestimmte Gen-Region mit einer relativ geringen Anzahl von Variationen ausgerichtet sind, kann SARS-CoV-2 möglicherweise weitere Variationen in dieser Region annehmen und die Sensitivität dieses Produkts verringern. Deshalb kann eine SARS-CoV-2-Infektion trotz negativen Tests nicht immer ausgeschlossen werden.
- (3) Die Testergebnisse können durch Probenahme und -transport, Probenvorbereitung, Inhibitoren und andere Verfahrensfehler im Labor beeinträchtigt werden. Ein negativer Test schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2 in der Probe nicht aus. Für eine klinische Diagnose sind das Krankheitsbild des Patienten und alle weiteren vorliegenden Laborergebnisse zu berücksichtigen.
- (4) Bei diesem Produkt handelt es sich um ein Kit für einen qualitativen Nachweis; es ist nicht für eine quantitative Messung vorgesehen. Die Intensität des beobachteten Fluoreszenzlichts oder die Anstiegszeit der vom Real-Time Turbidimeter gemessenen Trübung korreliert nicht mit der Menge an Template-RNA.

**STÖRSUBSTANZEN**

Störsubstanzen und -arzneimittel

Interne Studien zeigten keine Beeinflussung der Messung durch das Vorhandensein von freiem Bilirubin (77,6 mg/dl), konjugiertem Bilirubin (81,2 mg/dl), \*milk bis\* (Formazin-Trübung: 5.640), hämolisiertem Hämoglobin (1.964 mg/dl) oder Speichel.

Hinsichtlich Arzneimitteln ergaben interne Studien keine Beeinflussung der Messung durch das Vorhandensein von Minocyclin (2,40 µg/ml), Erythromycin (1,64 µg/ml), Piperacillin (52,00 µg/ml), Moxifloxacin (8,26 µg/ml) und Clindamycin (26,00 µg/ml).

**LEISTUNGSDATEN**

**1. Sensitivität und Genauigkeit**

Beim Testen der folgenden Proben:

- Negative Probe (Konzentration: 0 Genome/Test)
- Positive Probe 1 (250 Genome/Test)
- Positive Probe 2 (1 × 10<sup>4</sup> Genome/Test)

Die negative Probe wird negativ getestet und die positiven Proben 1 und 2 werden positiv getestet.

**2. Reproduzierbarkeit innerhalb einer Testserie**

Beim Testen von fünf negativen und positiven Proben gleichzeitig wird die negative Probe durchgehend negativ getestet und die positive Probe durchgehend positiv getestet.

**3. Nachweisgrenze**

60 Genomäquivalente/Test)

**4. Kreuzreaktivität**

SARS Frankfurt-1 zeigte keine Kreuzreaktion bis zu 4×10<sup>6</sup> Kopien/Test, jedoch wurde eine leichte Kreuzreaktion bei mehr als 4×10<sup>7</sup> Kopien/Test beobachtet. Für die in den folgenden Tabellen aufgelisteten weiteren Coronaviren, weiteren Atemwegserkrankungen verursachenden Viren und Organismen wurde genomische RNA oder DNA extrahiert, gereinigt und gemessen mithilfe von 1×10<sup>5</sup> - 4×10<sup>8</sup> Kopien/Testäquivalent für Viren und 1 ng/Test für Organismen. Alle Ergebnisse waren negativ und es wurden keine Kreuzreaktionen festgestellt.

Virusbezeichnung	Virusbezeichnung
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus EMC	Humanes Coronavirus 229E VR-740
Humanes Coronavirus HKU1_Tokyo/SGH-15/2014	Humanes Coronavirus 229E_Sendai-H/1121/04
Humanes Coronavirus HKU1_Tokyo/SGH-18/2016	Humanes Coronavirus 229E_Niigata/01/08
Humanes Coronavirus OC43_VR-1558	Influenza-A-Virus (A/Texas/50/2012(H3N2))
Humanes Coronavirus OC43_Tokyo/SGH-36/2014	Influenza-A-Virus (A/Narita/1/2009(H1N1))
Humanes Coronavirus OC43_Tokyo/SGH-61/2014	Influenza-B-Virus (B/Massachusetts/2/2012)
Humanes Coronavirus OC43_Tokyo/SGH-6/2015	Influenza-B-Virus (B/Brisbane/60/2008)
Humanes Coronavirus OC43_Tokyo/SGH-65/2016	Influenza-B-Virus (B/Texas/2/2013)
Humanes Coronavirus NL63_Amsterdam I	Respiratorisches Synzytial-Virus – A2

Humanes Coronavirus NL63_Tokyo/SGH-15/2017	Respiratorisches Synzytial-Virus – B1
Humanes Coronavirus NL63_Tokyo/SGH-24/2018	

Fungusbezeichnung	Fungusbezeichnung
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Klebsiella pneumoniae Subsp. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gruppe B)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Legionella pneumophila Subsp. pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 15531
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 29342
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama	

**5. Information über Kalibrierung**

Für den Leistungstest dieses Produkts wurde RNA-Transkript aus Plasmid-DNA mit dem N-Gen und RdRp-Gen der Genom-RNA von SARS-CoV-2 als Kalibrator verwendet.

**6. Proben-Standardleistung**

Proben vom japanischen National Institute of Infectious Diseases, 10 positive und 15 negative Proben, behandelt gemäß „National Institute of Infectious Diseases pathogen detection manual 2019-nCoV Ver. 2.6“, wurden mittels Trübungsnachweis unter Verwendung von Real-Time Turbidimeter LA-500 und optischem Fluoreszenznachweis gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine positive Konkordanzrate von 90 % (9/10) bzw. negative Konkordanzrate von 100 % (15/15), die Gesamtkonkordanzrate lag bei 96 % (24/25) sowohl für Trübungsnachweis als auch optischen Nachweis. Im PCR-Test positiv und im LAMP-Test negativ getestete Proben wiesen Konzentrationen unterhalb der Produktnachweisgrenze auf.

	Produkte (LAMP)		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Referenzprodukt (PCR-Test)	9	1	10
	0	15	15
Gesamt	9	16	25

Speichelproben, 10 positive und 19 negative Proben, in den in „Evaluation of performance of genetic testing for new coronavirus (2019-nCoV)“ beschriebenen, im National Institute of Infectious Diseases vorbereiteten Konzentrationen, wurden in ähnlicher Weise mittels Trübungsmessung unter Verwendung von Real-Time Turbidimeter LA-500 und optischem Fluoreszenznachweis gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine positive Konkordanzrate von 90 % (9/10) bzw. negative Konkordanzrate von 100 % (19/19), die Gesamtkonkordanzrate lag bei 97 % (28/29) sowohl für Trübungsnachweis als auch optischen Nachweis. Die negativen Proben lagen unterhalb der Produktnachweisgrenze.

	Anzahl Studien	Anzahl positiver Testergebnisse
Positive Proben	10	9
Negative Proben	19	0

**VORSICHTSMASSNAHMEN FÜR VERWENDUNG UND UMGANG**

**Vorsichtsmaßnahmen für Umgang (Gefahrenprävention)**

- 1) Proben sind aufgrund des von ihnen ausgehenden Infektionsrisiko mit Vorsicht zu behandeln, und es sollten die notwendigen Maßnahmen gegen eine Biogefährdung getroffen werden. Siehe aktuelle Sicherheitsvorschriften des National Institute of Infectious Diseases.
- 2) PM nCV19, PC nCV19 und NC enthalten geringe Mengen an Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid darf aufgrund seiner Giftigkeit nicht in Augen oder Mund und nicht auf die Haut gelangen.
- 3) Bei versehentlichem Kontakt des Reagenz mit Augen, Mund oder Haut sollte die betroffene Stelle umgehend mit reichlich Wasser gespült und bei Bedarf ein Arzt konsultiert werden.
- 4) Die von der Lampe emittierte UV-Strahlung (bakterizide Strahlung) ist bei Verwendung eines UV-Strahlengeräts für den optischen Fluoreszenznachweis schädlich. Ein direkter Blick in die Lichtquelle, auch für kurze Zeit, kann Augenschmerzen und

konjunktivitisähnliche Symptome hervorrufen. Niemals direkt in das UV-Licht blicken. Sollte während der Bestrahlung die Einsehbarkeit der Lampe notwendig sein, sollte der Nachweis durch eine Glasscheibe oder beim Tragen einer breiten Auswahl an Schutzbrillen oder Schutzschichten durchgeführt werden.

#### Vorsichtsmaßnahmen für die Verwendung

- 1) Die Reagenzien sollten entsprechend der angegebenen Lagerweise gelagert werden. Kryokonservierung ist im Sinne des Qualitätserhalts zu vermeiden.
- 2) Zur Verhinderung der Reagenzienzersetzung sollten nur die erforderlichen Reagenzien aus dem Kit-Behälter entnommen werden.
- 3) Zur Verhinderung der Kontamination von Testumgebungen sollte PC nCV19 nur in der gemäß dieser Packungsbeilage beschriebenen Weise verwendet werden (z. B. keine Dilution oder Probenzusätze).
- 4) PC nCV19 und mutmaßlich positive Proben sollten getrennt von anderen Reagenzien gelagert werden.
- 5) Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- 6) Nicht in Kombination mit anderen Chargen verwenden. Reagenzien nicht ersetzen.

#### Umgang mit Getrocknetem RNA-Amplifikationsreagenz

- 1) Aus dem Kühlschrank (2–8 °C) entnommene Reagenzien sollten vor dem Öffnen der Aluminiumpackung wieder auf Zimmertemperatur gebracht werden.
- 2) Sicherstellen, dass Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz getrocknet und am Verschluss des Reaktionsröhrchens (innerhalb der Rippe) zurückgeblieben ist. Keinen übermäßigen Druck auf den Verschluss ausüben. Die Verschlussinnenseite nicht direkt berühren.
- 3) Getrocknetes RNA-Amplifikationsreagenz wird durch Wärme, Licht und Feuchtigkeit zersetzt. Die erforderliche Probenanzahl (Anzahl Proben + 2) sollte entnommen, unverzüglich in die Original-Aluminiumpackung zurück verbracht, fest verschlossen und im Kühlschrank (2–8 °C) gelagert werden.
- 4) Im Umgang mit Getrocknetem RNA-Amplifikationsreagenz ist aufgrund der leicht zerbrechlichen Reaktionsröhrchen Vorsicht geboten. Vor der Verwendung optisch prüfen, ob das Reaktionsröhrchen frei von Kratzern, Rissen etc. ist. Bei Schäden am Röhrchen kann der Test nicht korrekt ausgeführt werden und andere Geräte können durch Röhrchenbruch kontaminieren.
- 5) Sterilisation mittels UV-Bestrahlung vermeiden, da Verfärbungen durch UV-Strahlung zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.

#### BESTELLINFORMATIONEN

Produkt-nummer	Produktbezeichnung	Inhalt
LMC403	Loopamp™ SARS-CoV-2 Detection Kit	48 Tests
LMC801	Loopamp™ Viral RNA Extraction Kit	48 Tests
MVL300	LA-500	1 Kontrollgerät 1 Amplifikationsgerät

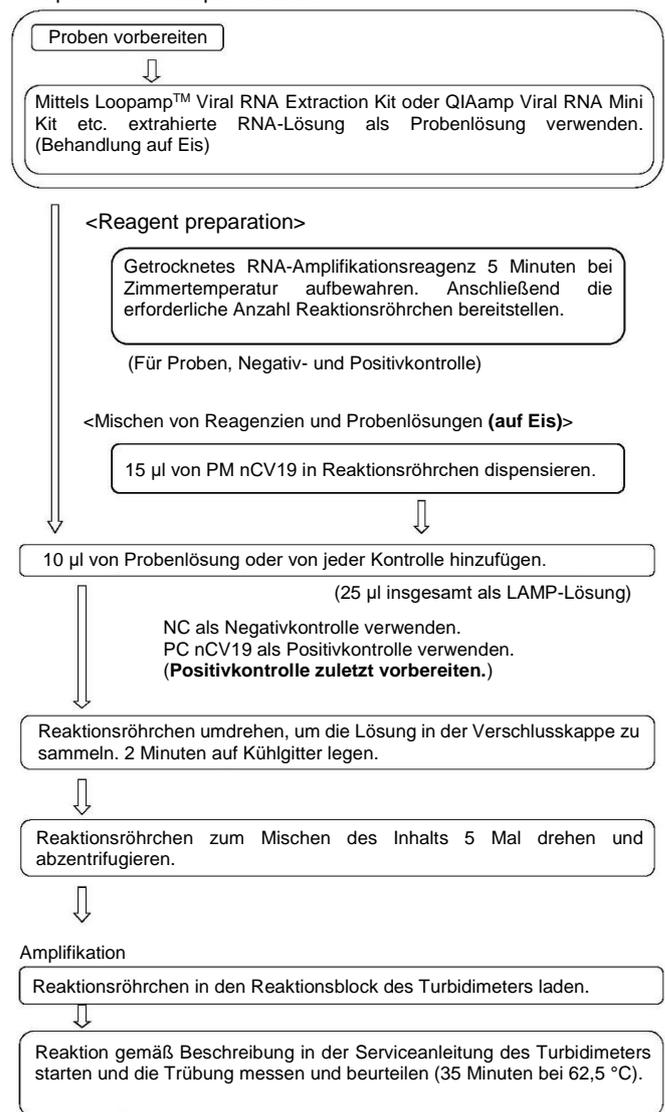
#### LITERATUR

- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research, 28(12), e63, 2000.
- 2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem., 47(9), 1742-1743, 2001.
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 289(1), 150-154, 2001.
- 4) Tomita N., et al.: Nat Protoc., 3(5), 877-882, 2008

#### Ablaufdiagramm

#### Vorgehensweisen für Echtzeit-Trübungsmessung

<Preparation of sample solution>



Abschluss der Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei 80 °C oder 2 Minuten bei 95 °C) bestätigen. Alle Reaktionsröhrchen aus dem Turbidimeter entnehmen und ungeöffnet entsorgen. Dabei darauf achten, die Röhrchen nicht zu beschädigen.

IVD



EC REP

Advena Ltd.

Tower Business Center, 2nd Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

4-19-9 Taito, Taito-ku, Tokyo 110-8408, Japan

Veröffentlichungsdatum: 25. August 2020