

ViroReal[®] Kit SARS-CoV-2 & SARS

Gebrauchsanweisung



CE

IVD

In-vitro-Diagnostikum

REF

DHUV02353



50

REF

DHUV02313



100

REF

DHUV02313x5



500



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

Index

1. Verwendungszweck	3
2. Produktbeschreibung	3
3. Erregerinformation	3
4. Inhalt, Stabilität und Lagerung	4
4.1. Inhalt Bestellnummer DHUV02353 und DHUV02313	4
4.2. Inhalt Bestellnummer DHUV02313x5	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. Pipettierschema für Bestellnummer DHUV02353 und DHUV02313	7
8.2. Pipettierschema für Bestellnummer DHUV02313x5	8
8.3. Programmierung des Temperaturprofils	8
9. Interpretation der PCR-Daten	9
9.1. Signal im FAM-Kanal	9
9.2. Kein Signal im FAM-Kanal, aber ein Signal mit RNA IPC	9
9.3. Keine Signale im FAM-Kanal und kein Signal mit IPC	9
10. Troubleshooting	10
10.1. Kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe	10
10.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Probe	10
10.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle	10
10.4. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion	10
11. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance	11
11.1. Testperformance	11
11.2. Nachweisgrenze und Linearität	11
11.3. Analytische Spezifität	12
11.4. Diagnostische Evaluierung	12
12. Literatur	12

Erklärung der Symbole

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

1. Verwendungszweck

ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS ist ein *in-vitro* Diagnostik Test zum Nachweis von RNA für das N Gen von SARS-CoV-2 und SARS-CoV mittels one-step reverse Transkription real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Das Kit ermöglicht den schnellen und empfindlichen Nachweis von RNA von SARS-CoV-2 und SARS-CoV in Proben aus dem Respirationstrakt.

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. Andere Beta-Coronaviren werden mit diesem Test nicht nachgewiesen. Die ausgewählten Primer und Sonden sollten mögliche zukünftige Änderungen der Virussequenz abdecken und sind daher nicht identisch mit den von der WHO vorgeschlagenen Primern und Sonden. Dieser Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV Stämmen, 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 RT-PCR Inhibitionskontrolle. Das Target für die RNA IPC wird während der Probenextraktion zugegeben.

Dieser Test wurde für die Verwendung mit dem Applied Biosystems® (ABI) 7500-Instrument (Thermo Fisher Scientific), LightCycler® 480 II (Roche), cobas Z 480 Analyzer (Roche) und Mx3005P® (Agilent) entwickelt. Er eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren können.

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 in einem 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 namens COVID-19 (corona virus disease 2019). Fieber, Husten und Atembeschwerden werden als die häufigsten Anfangssymptome beschrieben, eine Infektion kann in weiterer Folge auch zu einer Lungenentzündung führen. Das Coronavirus wird hauptsächlich durch Tröpfchen oder Kontakt übertragen. In den meisten Fällen kann ein leichter Verlauf der Infektion beobachtet werden, 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 DHUV02353 und DHUV02313

		DHUV02353	DHUV02313	
Beschriftung	Inhalt	Menge 50 Reaktionen	Menge 100 Reaktionen	Lagerung
SARS-CoV-2 & SARS Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für Virus Detektion	1 x 50 µl	2 x 50 µl	-15°C bis -25°C
RNA IPC-3 Assay Mix (gelber Verschluss)	Primer und Sonde (Cy5) für RNA IPC Detektion	1 x 50 µl	2 x 50 µl	-15°C bis -25°C
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC	1 x 100 µl	1 x 100 µl	-15°C bis -25°C
SARS-CoV-2 Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (10 ³ Kopien/µl)	1 x 120 µl	1 x 120 µl	-15°C bis -25°C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktionsmix	1 x 250 µl	2 x 250 µl	-15°C bis -25°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	1 x 1000 µl	-15°C bis -25°C

4.2. Inhalt Bestellnummer DHUV02313x5

		DHUV02313x5	
Beschriftung	Inhalt	Menge 500 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)	5 x 100 µl	-15°C bis -25°C
RNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für RNA IPC	1 x 500 µl	-15°C bis -25°C
SARS-CoV-2 Positive Control (roter Verschluss)	RNA Positivkontrolle (10 ³ Kopien/µl)	1 x 120 µl	-15°C bis -25°C
RNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	RNA Reaktionsmix	5 x 500 µl	-15°C bis -25°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	3 x 1000 µl	-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
- Pipettenspitzen mit Filter
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße

Beispiele für Real-Time-PCR-Instrumente mit den erforderlichen Farbstoffkanälen FAM (510 nm) und Cy5 (667 nm):

ABI® 7500, QuantStudio™ 5 oder 6 mit der richtigen Farbkalibrierung (Thermo Fisher Scientific), Mx3005P® (Agilent), LightCycler® 480 I, II oder Cobas z 480 Analyzer (Roche), Rotor-Gene Q 5plex (QIAGEN), CFX96 (BioRad), MIC (Corbett) oder qTOWER mit Modul 1 & 5 (Analytik Jena)

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.
- 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.
- In jedem PCR-Lauf muss eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe) mitgeführt werden.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse sollte eine Negativkontrolle während der RNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Virus RNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen, entsorgt werden.
- Bitte beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.
- **Vorsicht:** Das RNA IPC Target wird in RNA-Stabilizer aufbewahrt, welcher Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält (siehe MSDS, www.ingenetix.com).

7. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Aufarbeitung der Proben gewährleistet.
- Mit diesem Kit wurde die Detektion von SARS-CoV-2 RNA aus Proben aus dem Respirationstrakt validiert. Die Testperformance mit anderen klinischen Probentypen wurde bislang noch nicht bewertet.
- 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.
- Obwohl dieser Test hochspezifische Primer und Sonden 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

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

Das **RNA IPC Target** wird während der Extraktion zugesetzt. Die RNA IPC dient der Kontrolle der Extraktion, identifiziert mögliche PCR Inhibierungen und überprüft die Integrität der Kit Reagenzien.

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

→ Pro Probe Zugabe von 1 µl RNA IPC Target zum Lysepuffer.

Die RNA unmittelbar nach der Extraktion verwenden (immer auf Eis lagern) und so bald als möglich bei -20°C bis -80°C lagern.

- Pro PCR-Lauf sollten eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der PCR (Wasser) und eine Negativkontrolle der RNA-Extraktion mitgeführt werden.
- Ingenetix empfiehlt, Proben in Duplikaten zu analysieren, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern.
- 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.
- **SARS-CoV-2 Positivkontrolle** ist eine *in vitro* synthetisierte RNA mit einer Konzentration von 10³ Kopien/µl und muss bei -20 ° C gelagert werden. Verwenden Sie als Positivkontrolle 10 µl SARS-CoV-2 Positive Control (roter Verschluss). Die Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

8.1. Pipettierschema für Bestellnummer DHUV02353 und DHUV02313

		Pro Probe
Ansetzen Master Mix (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	3.0 µl
	RNA Reaction Mix	5.0 µl
	SARS-CoV-2 & SARS Assay Mix	1.0 µl
	RNA IPC-3 Assay Mix	1.0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix	10.0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	10.0 µl
	RNA-Probe*	10.0 µl
	Gesamtvolumen	20.0 µl

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

→ **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.

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

8.2. Pipettierschema für Bestellnummer DHUV02313x5

		Pro Probe
Ansetzen Master Mix (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
	Gesamtvolumen Master Mix	10.0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	10.0 µl
	RNA-Probe*	10.0 µl
	Gesamtvolumen	20.0 µl

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

→ **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.

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

8.3. Programmierung des Temperaturprofils

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

Probenvolumen: 20 µl

Temperaturprofil:

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

Für ABI PRISM® 7500:

Ramp speed: Without "fast cycling" parameter

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

Für cobas z 480 Analyzer (Roche):

FAM: Anregung bei 465 nm, Emission bei 510 nm

Cy5: Anregung bei 610 nm, Emission bei 670 nm

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

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. Bitte überprüfen Sie 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.

Für eine gültige Interpretation müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

	FAM Kanal SARS-CoV-2 und SARS-CoV Target	Cy5 Kanal RNA IPC Target	Bewertung
Negativkontrolle	Negativ	Positiv ¹⁾	Valid
Positivkontrolle	Positiv	Positiv ¹⁾	Valid
Negative Extraktionskontrolle	Negativ	Positiv	Valid
Negative Probe	Negativ	Positiv ²⁾	Valid
Positive Probe	Positiv	Positiv/Negativ ³⁾	Valid

¹⁾Nur positiv, wenn das 1:500 frisch verdünnte RNA IPC Target direkt zum Master Mix zugegeben wurde.

²⁾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.

³⁾Eine hohe Viruskonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der RNA IPC führen.

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten RNA-Probe wiederholt werden (siehe 10. Troubleshooting).

9.1. Signal im FAM-Kanal

→ Die RNA von SARS-CoV-2 oder SARS-CoV wurde amplifiziert. Die Probe ist als positiv zu interpretieren.

9.2. Kein Signal im FAM-Kanal, aber ein Signal mit RNA IPC

→ In der Probe ist keine RNA von SARS-CoV-2 oder SARS-CoV nachweisbar. Die Probe ist als negativ zu interpretieren.

Das positive Signal des RNA-IPC schließt eine mutmaßliche RT-PCR-Inhibierung aus.

9.3. Keine Signale im FAM-Kanal und kein Signal mit IPC

→ Es kann keine Interpretation vorgenommen werden.

Informationen zu möglichen Fehlerquellen und deren Lösung finden Sie unter 10. Troubleshooting.

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.

10.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, 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.

10.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle

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

10.4. 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.

11. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

11.1. Testperformance

Abbildung 1 zeigt die Performance von ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS mit dem ABI® 7500 Instrument (Thermo Fisher Scientific).

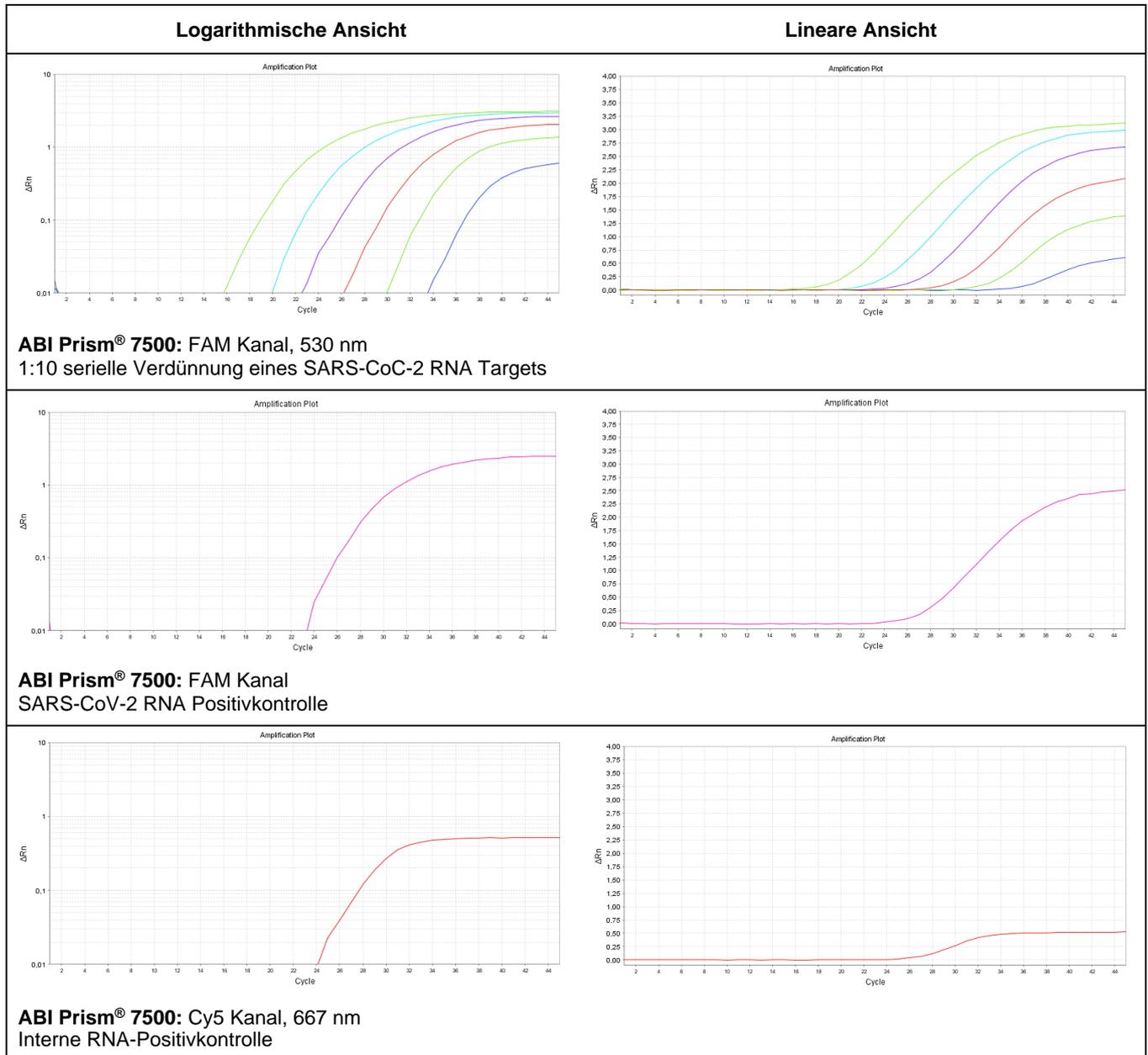


Abbildung 1. Die Performance des ViroReal® Kit SARS-CoV-2 & SARS

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 1 Target Kopie/Reaktion nachgewiesen werden.

Die **Nachweisgrenze** (LoD95: Anzahl an Kopien, welche in 95% der Fälle positiv detektiert werden) beträgt 13 Kopien/Reaktion.

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 2).

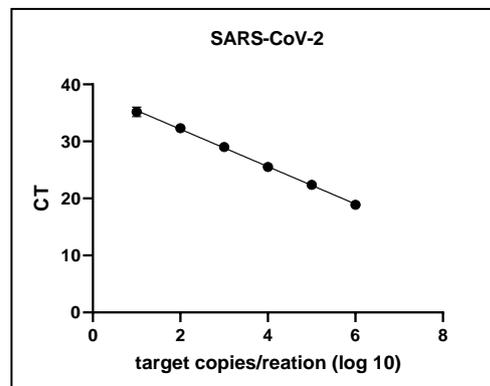


Abbildung 2 10-fache Verdünnungsreihe einer synthetischen SARS-CoV-2 RNA

11.3. Analytische Spezifität

Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Eine hochkonservierte Region in allen SARS-Coronavirus Clustern des N Gens wurde als Target-Region ausgewählt. Die ausgewählten Primer und Sonde sollten mögliche zukünftige Änderungen der Virussequenz abdecken und sind daher nicht identisch mit den von der WHO vorgeschlagenen Primern und Sonden. *In silico* Validierung der Primer und Sonden wurde mit dem basic local alignment tool (BLAST) in der NCBI 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 Sonden in allen SARS-Coronavirus Clustern. Dieser Ansatz ermöglicht den universellen Nachweis aller bisher bekannten SARS-CoV Stämmen, 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 SARS-ähnlichen CoV. Andere Beta-Coronaviren werden mit diesem Test nicht nachgewiesen.

11.4. Diagnostische Evaluierung

Für die diagnostische Evaluierung 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 II Instrument (Roche) durchgeführt.

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 (Cp-Wert: 35,5). Die restlichen 78 Proben waren mit beiden Methoden negativ.

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>