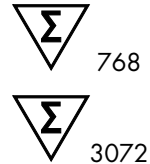


Juli 2021

artus[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Gebrauchsanweisung (Handbuch)



Version 1



In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung auf den Geräten Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM
und ABI[®] 7500 Fast Dx



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R2

Inhalt

Verwendungszweck	4
Beschreibung und Prinzip	5
Angaben zum Pathogen	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	9
Kit-Inhalt	9
Kitkomponenten	10
Plattformen und Software	11
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	12
Verbrauchsmaterialien	12
Ausstattung/Geräte	12
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	13
Sicherheitshinweise	13
Vorsichtsmaßnahmen	14
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	15
Probentransport, -lagerung und -handhabung	15
Probenentnahme, -transport und -lagerung	15
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem RGQ MDx 5plex HRM	16
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem ABI 7500 Fast Dx	22
Ergebnisse	27

Interpretation der Ergebnisse.....	29
Anwendungseinschränkungen	32
Leistung	33
Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)	33
Analytische Spezifitätsstudien (Inklusivität und Exklusivität/Kreuzreaktivität)	33
Störsubstanzen	39
Präzision	40
Klinische Leistungsmerkmale	41
Literatur	45
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	46
Symbole	48
Kontakt.....	49
Bestellinformationen	50
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	51

Verwendungszweck

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist ein Real-time-RT-PCR-Test für den qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren von SARS-CoV-2 in nasopharyngealen Abstrichen (Nasopharyngeal Swab, NPS), nasalen Abstrichen und oropharyngealen Abstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer Infektion oder Personen ohne Symptome oder sonstige Hinweise, die den Verdacht auf eine COVID-19-Infektion begründen.

Es ist in Kombination mit klinischen Beobachtungen, der Anamnese sowie epidemiologischen Informationen als Hilfsmittel für die Diagnose von COVID-19 in der akuten Phase der Infektion vorgesehen.

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist für die Verwendung in einer molekularbiologischen Laborumgebung durch professionelle Anwender, wie z. B. geschultes klinisches Laborpersonal, das in den Techniken der Real-time PCR und *in-vitro*-diagnostischen Verfahren ausgebildet wurde, vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und dürfen nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen des Patientenmanagements dienen.

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist für die Verwendung mit dem Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System oder dem ABI 7500 Fast Dx als Real-time PCR-System vorgesehen.

Beschreibung und Prinzip

Angaben zum Pathogen

Bei den Coronaviren, einer Gattung der Familie der *Coronaviridae*, handelt es sich um große umhüllte positiv-strängige RNA-Viren, die hochansteckende Krankheiten bei Menschen und Haustieren verursachen (1). Coronaviren, die den Menschen infizieren, sind nachweislich für ein Drittel der normalen Erkältungsinfektionen verantwortlich. Sie sind außerdem ursächlich bekannt für nosokomiale Infektionen der oberen Atemwege bei Frühgeborenen (2).

Ein neues Mitglied der Coronavirus-Familie verursachte einen Ausbruch der Atemwegserkrankung in der Stadt Wuhan in China (1, 3). Das zunächst als neuartiges Coronavirus (2019-nCoV) bezeichnete SARS-CoV-2 unterscheidet sich vom SARS-CoV (1, 3), das für den Ausbruch im Jahr 2003 verantwortlich war, sowie vom MERS-CoV, das seit 2012 im Nahen Osten zirkuliert. SARS-CoV-2 ist der Erreger der Krankheit COVID-19. Die SARS-CoV-2-RNA ist in der frühen und akuten Phase der Infektion in verschiedenen Proben aus dem oberen Respirationstrakt (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) nachweisbar (3).

In Verbindung mit der Anamnese und der SARS-CoV-2-Epidemiologie sind RT-PCR-Assays zum Goldstandard für die Diagnose von SARS-CoV-2 geworden. Das Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) hat vorgeschlagen, RT-PCR-basierte Assays mit Immunoassays zu kombinieren, um den Infektionsstatus zu überwachen und die Effizienz der restriktiven Maßnahmen zur Kontrolle des Ausbruchs zu bewerten (4, 5).

Der SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Assay zielt auf 2 virale Gene (N1- und N2-Gen) ab, die im selben Fluoreszenzkanal detektiert werden. Es erfolgt keine Differenzierung zwischen den beiden Zielgenen, sodass die Amplifikation eines beliebigen dieser zwei Gene zu einem Fluoreszenzsignal führt. Positive Ergebnisse deuten auf die Gegenwart des SARS-CoV-2-Virus hin, schließen eine Koinfektion mit anderen Pathogenen jedoch nicht aus. Andererseits schließen negative RT-PCR-Ergebnisse eine mögliche Infektion nicht aus.

Zusammenfassung und Erläuterung

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist ein gebrauchsfertiges System mit einem einfachen Schritt zur Probenvorbereitung, auf den die Detektion der SARS-CoV-2-RNA mittels RT-PCR entweder auf dem RGQ MDx System oder auf den ABI 7500 Fast Dx Plattformen folgt (Abbildung 1). Der SARS-CoV-2 UM Amp Buffer enthält die Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation einer 72-Basenpaar(bp)-Region und einer 67-bp-Region aus dem RNA-Genom von SARS-CoV-2 und für den direkten Nachweis der Amplifikate im Fluoreszenzkanal „Green“ des RGQ MDx Geräts sowie mit dem Fluoreszenzfilter A/1 des ABI 7500 Fast Dx.

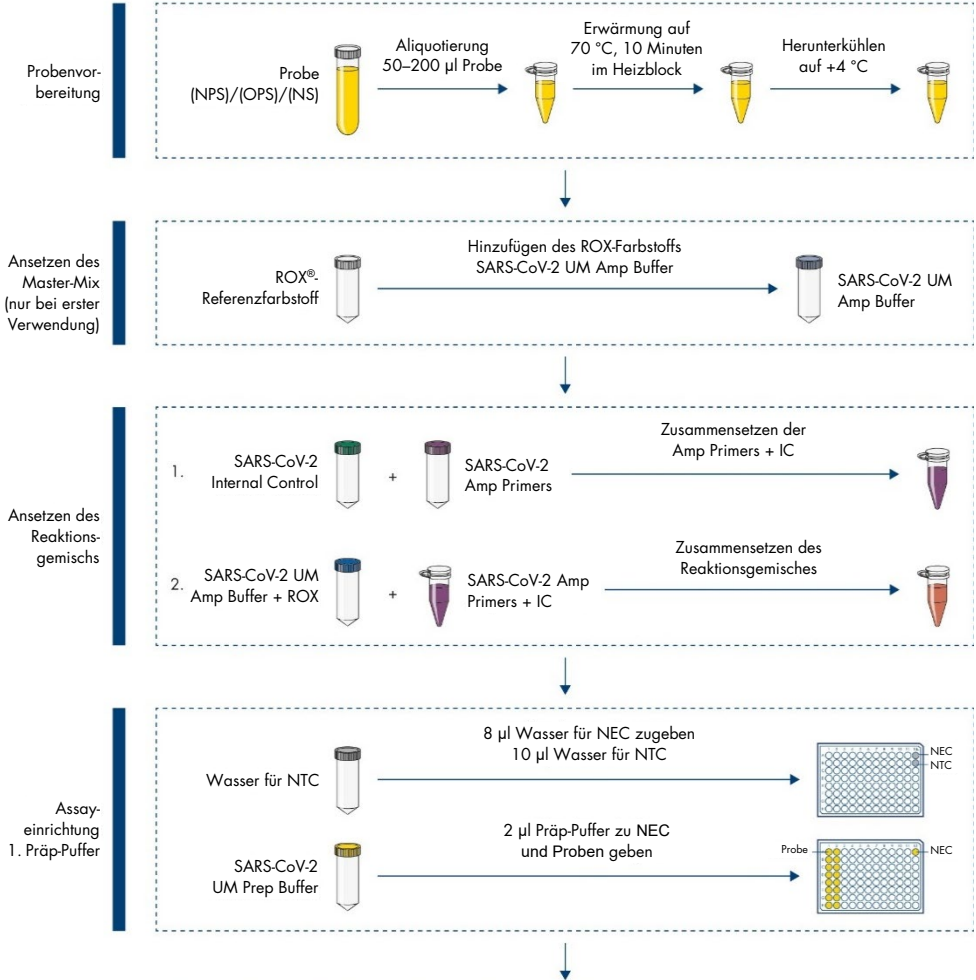
Das Primer- und Sondengemisch des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit enthält auch die für die RNAse P-Amplifikationen benötigten Oligonukleotide. Wenn diese Amplifikate im Fluoreszenzkanal „Yellow“ des RGQ MDx Geräts oder mit dem Fluoreszenzfilter B/2 des ABI 7500 Fast Dx detektiert werden, ist gewährleistet, dass ausreichend biologische Probe auf dem Tupfer gesammelt wurde. Diese Kontrolle ist entscheidend, um das Vorhandensein von biologischen Proben in SARS-CoV-2-negativen Proben sicherzustellen. Eine Amplifikation sollte immer nachweisbar sein, da sie sonst die Qualität der Probe in Frage stellt.

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit enthält zudem ein drittes heterologes Amplifikationssystem zur Erkennung einer möglichen RT-PCR-Inhibition. Dies erfolgt über die Detektion einer internen RNA-Kontrolle (Internal Control, IC) im Fluoreszenzkanal „Red“ des RGQ MDx Geräts und mit dem Fluoreszenzfilter E/5 des ABI 7500 Fast Dx. Da die IC im SARS-CoV-2 Amp Primers Mix enthalten ist, sollte ihre Amplifikation konstant sein, es sei denn, es ist ein RT-PCR-Inhibitor in der Probe oder in der RT-PCR-Reaktion vorhanden, der die Amplifikation verzögert oder verhindert.

Externe Positiv- und Negativkontrollen (SARS-CoV-2 Positive Control bzw. nukleasefreies Wasser als Kontrolle ohne Template [No Template Control, NTC]) sind im *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit enthalten, um die korrekte Durchführung des PCR-Schritts zu bestätigen. Eine Kontrolle ohne Extraktion (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer als NEC verwendet) wird dringend empfohlen, um die Abwesenheit von RT-PCR-Inhibitoren im Vorbereitungspuffer zu überprüfen.

Zusammengenommen überwachen diese Kontrollen die Effizienz der reversen Transkription und der PCR-Schritte.

Arbeitsablauf des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

(Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

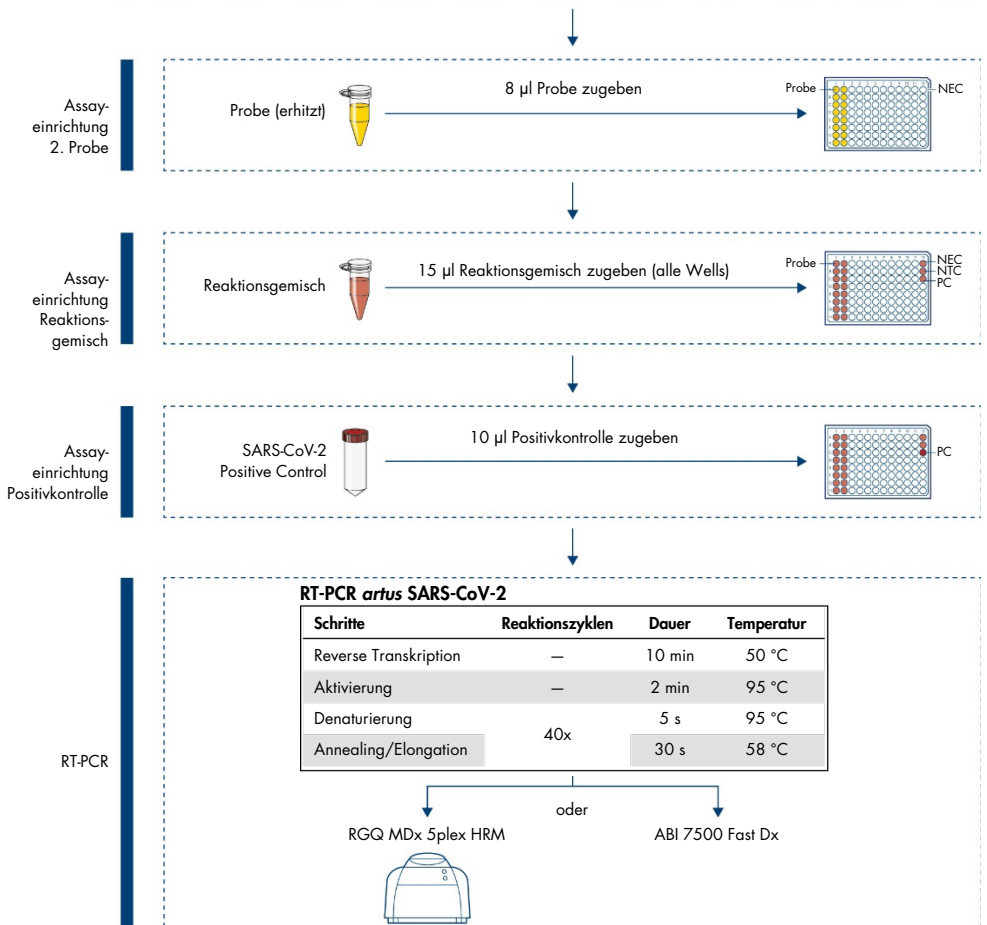


Abbildung 1 Arbeitsablauf des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
Katalog-Nr.				4511460	4511469
Anzahl der Reaktionen				768	3072
Röhrchenfarbe	Deckelfarbe	Identität	Röhrchen-ID	Volumen (µl)	Volumen (µl)
Transparent	Gelb	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Vorbereitungspuffer)	2 x 930	8 x 930
Transparent	Blau	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix (Master-Mix)	4 x 1440	16 x 1440
Transparent	Lila	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Primer und Sonden)	4 x 1680	16 x 1680
Transparent	Grün	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (IC) (Interne Kontrolle)	1 x 1390	4 x 1390
Transparent	Rot	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Positivkontrolle)	1 x 220	4 x 220
Transparent	Transparent	Water for NTC (Wasser für NTC)	Water (NTC) (Wasser (NTC))	1 x 1900	4 x 1900
Transparent	Transparent	ROX Reference Dye (ROX-Referenzfarbstoff)	ROX Dye (ROX-Farbstoff)	1 x 210	4 x 210

Kitkomponenten

Reagenzien

Die Reagenzvolumen in den einzelnen Röhrchen sind für 8 Chargen je 96 Proben (Kit mit 768 Reaktionen) oder 32 Chargen je 96 Reaktionen (Kit mit 3072 Reaktionen) optimiert, einschließlich einer Positivkontrolle (Positive Control, PC), einer Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) und einer Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC).

Es können weniger oder mehr Proben analysiert werden, jedoch ist dann der Reagenzverbrauch suboptimal. Es wird empfohlen, mehrfache Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden. Die Reagenzien können aliquotiert werden, um mehrfache Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.

Primer und Sonden

Die Primer und Sonden, die auf die SARS-CoV-2-Sequenzen abzielen, basieren auf den Primern und Sonden, die von den US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) entwickelt wurden.

Kontrollen und Kalibratoren

Der Assay enthält 5 Kontrollen zur Überwachung der RT-PCR-Effizienz.

Interne Kontrolle (Internal Control, IC): Bei der internen Kontrolle handelt es sich um eine einzelsträngige IVT-RNA, die die Gegenwart von Kontaminanten nachweist, welche die reverse Transkription inhibieren könnten. Die interne Kontrolle überwacht auch die Effizienz der reversen Transkription in der Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) und der Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC).

Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC): Die Kontrolle ohne Template besteht aus nukleasefreiem Wasser. Sie wird der PCR-Platte zugegeben, um eine mögliche Einschleppung von Kontaminanten, die zu einer Fehlinterpretation der SARS-CoV-2-Ziele führen könnten, während der Vorbereitung der PCR-Platte zu verifizieren.

Positivkontrolle (Positive Control, PC): Die Positivkontrolle ist eine doppelsträngige DNA, die mit SARS-CoV-2 Primers and Probes (P&P Mix) amplifiziert ist. Ihr Nachweis bestätigt die Funktionsfähigkeit der am PCR-Amplifikationsschritt beteiligten Reagenzien.

Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC): Die Extraktionskontrolle besteht aus dem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Sie wird parallel zu den klinischen Proben verarbeitet, um eine mögliche Einschleppung von Kontaminanten, die zu einer Fehlinterpretation der SARS-CoV-2-Ziele führen könnten, während der Probenvorbereitung zu verifizieren.

Probenkontrolle: Die Probenkontrolle detektiert das RNase P Gen und ist entscheidend, um das Vorhandensein von biologischen Proben in SARS-CoV-2-negativen Proben sicherzustellen. Die Amplifikation der Probenkontrolle sollte immer nachweisbar sein, da sie sonst die Qualität der Probe in Frage stellt.

Plattformen und Software

Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers gewartet und kalibriert wurden. Dieses Kit kann für zwei Workflows verwendet werden, die den Einsatz des Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM oder des ABI 7500 Fast Dx Geräts und der jeweils entsprechenden Software erfordern:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.1 oder höher
- ABI 7500 Fast Dx: SDS Software, Version 1.4.1 oder höher

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Verbrauchsmaterialien

- Puderfreie Einmal-Laborhandschuhe
- Sterile und nukleasefreie Pipettenspitzen mit Filtern
- PCR-freie 1,5-ml- oder 2-ml-Röhrchen
- 0,1-ml-PCR-Röhrchen zur Verwendung mit dem Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Kat.-Nr. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ zur Verwendung mit der ABI 7500 Fast Dx qPCR Plattform (Applied Biosystems 96-Well-Platte, Kat.-Nr. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film zur Verwendung mit der ABI 7500 Fast Dx qPCR Plattform (Applied Biosystems, Kat.-Nr. 4360954)

Ausstattung/Geräte*

- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsröhrchen
- Pipetten (einstellbar)
- Vortexer
- Heizblock
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Kat.-Nr. 9002032) mit Rotor-Gene Q Software ab Version 2.3.1
- Rotor-Disc 72 Rotor (Kat.-Nr. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (Kat.-Nr. 9018900)
- 72-Well-Ladeblock (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, Kat.-Nr. 9018901)
- Ersatzweise: ABI 7500 Fast Dx qPCR Plattform (Thermo Fisher Scientific®, Kat.-Nr. 4406985) mit Software ab Version 1.4.1 und einer 96-Well-Plattenzentrifuge

* Stellen Sie vor dem Gebrauch und sofern zutreffend sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Bitte beachten Sie, dass Sie ggf. verpflichtet sind, Ihre lokalen Vorschriften zur Meldung schwerwiegender Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, an den Hersteller und die Regulierungsbehörde, welcher der Anwender und/oder der Patient unterliegt, zu konsultieren.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter www.qiagen.com/safety finden Sie zu jedem QIAGEN-Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als praktische und kompakte PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

Tragen Sie immer eine geeignete persönliche Schutzausrüstung, einschließlich, aber nicht beschränkt auf puderfreie Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille. Schützen Sie Haut, Augen und Schleimhäute. Wechseln Sie die Handschuhe häufig, wenn Sie mit Proben arbeiten.

Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln. Beachten Sie stets die in einschlägigen Richtlinien wie z. B. in *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections, Approved Guideline (M29)* des Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) oder in anderen relevanten Dokumenten beschriebenen Sicherheitsvorkehrungen.

Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.

Vorsichtsmaßnahmen

- Beachten Sie die üblichen Laborverfahren, um Ihren Arbeitsbereich sauber und kontaminationsfrei zu halten. Legen Sie einen Bereich mit spezifischer Ausstattung für die Arbeit mit RNA fest.
- Befolgen Sie die gute Laborpraxis, um Kreuzkontaminationen zu minimieren.
- Achten Sie darauf, eine Kontamination mit RNase während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie RNase-freie Kunststoffgefäße.
- Legen Sie Wert auf eine gute Rückführbarkeit mit schlüssigen Aufzeichnungen, insbesondere für die Probenidentifizierung.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die auf der Verpackung und den Etiketten aller Komponenten des Kits aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit kann bei -30 °C bis -15 °C für 6 Monate oder bis zum Verfallsdatum aufbewahrt werden.

Probentransport, -lagerung und -handhabung

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist für die Verwendung mit nasopharyngealen, nasalen und oropharyngealen Abstrichen bestimmt. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.

Die US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und Public Health England haben Richtlinien für die Entnahme, Handhabung und Testung von klinischen Proben erstellt. Weitere Informationen finden Sie in diesen Richtlinien oder in anderen relevanten nationalen Referenzlaborprotokollen.

Probenentnahme, -transport und -lagerung

Für die Entnahme, Lagerung und den Transport von Abstrichproben beachten Sie bitte die Empfehlungen des Herstellers. Die Abstrichtupfer müssen vollständig in das Transportmedium eingetaucht sein, um die Probenintegrität zu erhalten.

Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem RGQ MDx 5plex HRM

Dieses Protokoll beschreibt die Proben- und RT-PCR-Vorbereitung auf dem RGQ MDx 5plex HRM zum Nachweis der SARS-CoV-2-Ziele in menschlichen nasalen, nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedien gelagert werden.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die auf der Verpackung und den Etiketten aller Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen beachtet wurden. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Verwenden Sie gut gewartete und kalibrierte Geräte.
- Achten Sie während des Experiments darauf, Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden und nukleasefreie Kunststoffartikel zu verwenden.

Vorbereitende Schritte

- Die Proben können während der Vorbereitungsschritte und des Reaktionsaufbaus bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Lassen Sie den SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, die SARS-CoV-2 Amp Primers, die SARS-CoV-2 IC, das Wasser für NTC und die SARS-CoV-2 Positive Control bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auftauen. Bewahren Sie die Röhren bis zur Verwendung bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt auf.
- Homogenisieren Sie vor der Verwendung den SARS-CoV-2 UM Prep Buffer und den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer durch 2 bis 3-maliges Invertieren (nicht Vortexen) und anschließendes schnelles Schleudern. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3 bis 5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Invertieren und anschließendes schnelles Schleudern homogenisiert werden.

- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert in den klinischen Proben vorhandene RNasen für den Detektionsschritt, ist aber keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der qPCR-Plattform den Angaben in diesem Protokoll entsprechen.
- Die Reagenzien können aliquotiert werden, um mehrere Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.
- Bereiten Sie das Reaktionsgemisch frisch vor (< 2 h vor Beginn der RT-PCR).
- Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sollte die Vorbereitung der Proben und der RT-PCR in separaten Bereichen erfolgen.

Verfahren

1. Probenvorbereitung

- 1a. Vortexen Sie den Tupfer mit der Probe gründlich.
- 1b. Aliquotieren Sie 50–200 µl der Probe in PCR-freie 1,5-ml-Röhrchen.
- 1c. Führen Sie einen 10-minütigen Heizschritt bei 70 °C auf einem Heizblock durch. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.

2. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX-Referenzfarbstoff.

- 2a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
- 2b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
- 2c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.

3. Bereiten Sie für eine vollständige RGQ MDx-Platte (72 Wells) ein Aliquot einer Mischung aus SARS-CoV-2 Amp Primers und SARS-CoV-2 Internal Control vor.

- 3a. Übertragen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primer und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 1 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
- 3b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder Vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
- 3c. Zentrifugieren Sie die Lösung der SARS-CoV-2 Amp Primers mit der IC, sodass sie sich am Boden des Röhrchens sammelt.

Tabelle 1. Zusammensetzung des Gemischs aus SARS-CoV-2 Amp Primers+ IC

Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Anzahl der Reaktionen Volumen (µl)	
Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	1 Rkt.	72 Reaktionen (+22 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	132
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	770

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumina der SARS-CoV-2 UM Amp Primer und der SARS-CoV-2 Internal Control entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben an. Rechnen Sie ein Zusatzvolumen ein, um das Totvolumen auszugleichen.

4. Stellen Sie gemäß Tabelle 2 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich.

Tabelle 2. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

RT-PCR-Reaktionsgemisch			Anzahl der Reaktionen Volumen (µl)	
Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	1 Rkt.	72 Reaktionen (+20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer [†]	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2,9x	1x	8,75	756
Gesamtreaktionsvolumen		–	15,00	1296

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumina des SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und der SARS-CoV-2 Amp Primers entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben an. Rechnen Sie ein Zusatzvolumen ein, um das Totvolumen auszugleichen.

[†] Mit ROX-Referenzfarbstoff vervollständigter SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.

[‡] Mit SARS-CoV-2 Internal Control vervollständigte SARS-CoV-2 Amp Primers.

5. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das PCR-Röhrchen für die NEC.
6. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das PCR-Röhrchen für die NTC.
7. Dispensieren Sie 2 µl des SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes PCR-Röhrchen, das dem NEC und den vorbereiteten Proben zugewiesen ist.
8. Geben Sie 8 µl der vorbereiteten Probe in ein PCR-Röhrchen mit dem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.

9. Geben Sie 15 µl des in Schritt 4 angesetzten Reaktionsgemischs in die Röhrchen für die Proben und Kontrollen (Abbildung 2 dient als Beispiel). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren. Schließen Sie dann die Deckel aller PCR-Röhrchen mit Ausnahme des für die SARS-CoV-2 Positive Control vorgesehenen Röhrchens.

Hinweis: Vergewissern Sie sich, dass die Röhrchen fest verschlossen sind, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

10. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende PCR-Röhrchen. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.

11. Richten Sie das RT-PCR-Programm des RGQ MDx 5plex HRM gemäß den Angaben in Tabelle 3 ein.

Hinweis: Die Datenerfassung sollte während des Annealing-/Elongationsschritts erfolgen.

12. Stellen Sie die Röhrchen in einen Real-time-PCR-Thermocycler (Beispiel für die R hrchenanordnung siehe Abbildung 2) und starten Sie das Zyklusprogramm gemäß der Beschreibung in Tabelle 3.

Hinweis: Achten Sie darauf, dass die R hrchenposition und -reihenfolge zwischen dem Assay-Setup und den Schritten im Real-Time-Cycler gleich bleibt.

Tabelle 3. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Programm

Schritte	Dauer	Temperatur (�C)	Anzahl der Zyklen	Erfassung
Reverse Transkription	10 min	50	1	Nein
Anfängliche Hitzeaktivierung der PCR	2 min	95	1	Nein
2-Schritt-Zyklen				
Denaturierung	5 s	95	40	Nein
Annealing/Extension	30 s	58		Green (FAM), Yellow (HEX) und Red (Atto)

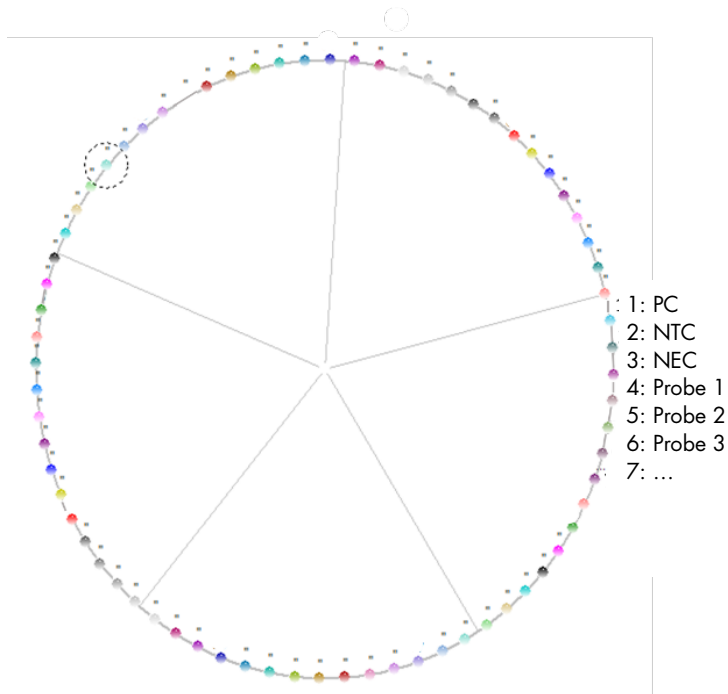


Abbildung 2. Beispiel für eine Röhrenanordnung auf der RGQ MDx 5plex HRM Plattform

13. Klicken Sie unter „New Run Wizard“ (Assistent für neue Läufe) auf **Gain optimization** (Verstärkungsoptimierung) und öffnen Sie **Auto-gain Optimization Setup** (Einrichtung der automatischen Verstärkungsoptimierung).

14. Vergewissern Sie sich, dass die Erfassungskanäle wie in Tabelle 4 beschrieben eingestellt sind.

Tabelle 4. RGQ MDx 5plex HRM Konfiguration

Name	Position PC-Röhrchen	Min. Messwert (FI)	Max. Messwert (FI)	Min. Verstärkung	Max. Verstärkung
Grün	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Hinweis:** Dies muss entsprechend der Position des Röhrchens mit der SARS-CoV-2 Positive Control geändert werden.

15. Wählen Sie **Perform optimization before the first acquisition** (Optimierung vor der 1. Erfassung durchführen).
16. Starten Sie den Lauf.
17. Analysieren Sie am Ende des Laufs die Ergebnisse (siehe Abschnitt Ergebnisse).

Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem ABI 7500 Fast Dx

Dieses Protokoll dient der Vorbereitung und dem Nachweis von SARS-CoV-2-Zielen in menschlichen nasalen, nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedien gelagert sind, auf dem ABI 7500 Fast Dx qPCR Gerät.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vergewissern Sie sich, dass die auf der Verpackung und den Etiketten aller Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen beachtet wurden. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.
- Verwenden Sie gut gewartete und kalibrierte Geräte.
- Achten Sie während des Experiments darauf, Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden und nukleasefreie Kunststoffartikel zu verwenden.
- Bei Verwendung des ABI 7500 Fast Dx muss dem Röhrchen mit Master-Mix vor der ersten Verwendung ROX-Farbstoff zugegeben werden.

Vorbereitende Schritte

- Die Proben können während der Vorbereitungsschritte und des Reaktionsaufbaus bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Bei Verwendung des ABI 7500 Fast Dx ist der ROX-Farbstoff erforderlich.
- **Die Daten müssen mit der ROX-Passivfarbstoffeinstellung erfasst werden.**
- Lassen Sie den SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, die SARS-CoV-2 Amp Primers, die SARS-CoV-2 IC, das Wasser für NTC und die SARS-CoV-2 Positive Control bei Raumtemperatur (15–25 °C) vollständig auftauen. Bewahren Sie die Röhrchen bis zur Verwendung bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt auf.

- Homogenisieren Sie vor der Verwendung den SARS-CoV-2 UM Prep Buffer und den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer durch 2 bis 3-maliges Invertieren (nicht Vortexen) und anschließendes schnelles Schleudern. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3 bis 5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Invertieren und anschließendes schnelles Schleudern homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert in den klinischen Proben vorhandene RNasen für den Detektionsschritt, ist aber keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der qPCR-Plattform den Angaben in diesem Protokoll entsprechen.
- Die Reagenzien können aliquotiert werden, um mehrere Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.
- Bereiten Sie das Reaktionsgemisch frisch vor (< 2 h vor Beginn der RT-PCR).
- Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sollte die Vorbereitung der Proben und der RT-PCR in separaten Bereichen erfolgen.

Verfahren

1. Probenvorbereitung
 - 1a. Vortexen Sie den Tupfer mit der Probe gründlich.
 - 1b. Aliquotieren Sie 50–200 µl der Probe in PCR-freie 1,5-ml-Röhrchen.
 - 1c. Führen Sie einen 10-minütigen Heizschritt bei 70 °C auf einem Heizblock durch. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.
2. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX-Referenzfarbstoff.
 - 2a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 2b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 2c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
3. Bereiten Sie für eine vollständige ABI 7500 Fast Dx-Platte (96 Wells) ein Aliquot einer Mischung aus SARS-CoV-2 Amp Primers und SARS-CoV-2 Internal Control vor.

- 3a. Übertragen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primers und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 5 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
- 3b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder Vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
- 3c. Zentrifugieren Sie die SARS-CoV-2 Amp Primers, die die IC enthalten, ab, damit sich die Lösung auf den Boden des Röhrchens absetzt.

Tabelle 5. Zusammensetzung des Gemischs aus SARS-CoV-2 Amp Primers+ IC

Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Anzahl der Reaktionen Volumen (µl)
Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	1 Rkt.	96 Reaktionen (+21 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	841
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	174
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	1015

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumina der SARS-CoV-2 UM Amp Primer und der SARS-CoV-2 Internal Control entsprechend der Anzahl der zu testenden Proben an. Rechnen Sie ein Zusatzvolumen ein, um das Totvolumen auszugleichen.

4. Stellen Sie gemäß Tabelle 6 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich.

Tabelle 6. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

RT-PCR-Reaktionsgemisch				Anzahl der Reaktionen Volumen (µl)
Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	1 Rkt.	96 Reaktionen (+20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer†	4x	1x	6,25	720
SARS-CoV-2 Amp Primers‡	2,9x	1x	8,75	1008
Gesamtreaktionsvolumen		–	15,00	1728

* **Hinweis:** Passen Sie das Volumen des SARS-CoV-2 UM Amp Buffers und der SARS-CoV-2 Amp Primers entsprechend der Anzahl zu testender Proben an. Rechnen Sie ein Zusatzvolumen ein, um das Totvolumen auszugleichen.

† Mit ROX-Referenzfarbstoff vervollständigter SARS-CoV-2 UM Amp Buffer

‡ Mit SARS-CoV-2 Internal Control vervollständigte SARS-CoV-2 Amp Primers

5. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NEC.
6. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NTC.

7. Dispensieren Sie 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes Well für die NEC und in die vorbereiteten Proben.
 8. Geben Sie 8 µl der vorbereiteten Probe in ein Well mit dem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
 9. Geben Sie 15 µl der in Schritt 4 vorbereiteten Reaktionsmischung in die für die Proben und Kontrollen vorgesehenen Vertiefungen (siehe Beispiel in Abbildung 3). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
 10. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende Well. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
 11. Versiegeln Sie die PCR-Platte, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Achten Sie darauf, gleichmäßigen Druck auf die ganze Platte auszuüben, um für alle Wells eine gute Abdichtung zu erreichen.
 12. Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Wells sammelt.
 13. Setzen Sie das RT-PCR-Programm des ABI 7500 Fast Dx gemäß Tabelle 7 in den Laufmodus „Standard 7500“.
- Hinweis:** Die Datenerfassung sollte während des Annealing-/Elongationsschritts erfolgen.
- Hinweis:** Weitere Informationen finden Sie in der *Gebrauchsanweisung für den ABI 7500 Fast Dx*.
14. Legen Sie die Platte in den Real-time-Cycler (ein Beispiel für das Layout einer PCR-Platte ist in Abbildung 3 zu finden) und starten Sie das Cycling-Programm, wie in Tabelle 7 beschrieben.
 15. Wählen Sie die genutzten Wells aus und wenden Sie die Reporter FAM, VIC und Cy5 an. Für die Datenerfassung muss der ROX-Passivfarbstoff auf **ON** (EIN) gestellt sein.
 16. Vergewissern Sie sich, dass die Standardkurve des ABI 7500 Fast Dx auf „Absolute Quantitation“ (Absolute Quantifizierung) eingestellt ist.
 17. Starten Sie den Lauf.
 18. Analysieren Sie am Ende des Laufs die Ergebnisse (siehe Abschnitt Ergebnisse).

Tabelle 7. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Programm

Schritte	Dauer	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen	Erfassung
Reverse Transkription	10 min	50	1	Nein
Anfängliche Hitzeaktivierung der PCR	2 min	95	1	Nein
2-Schritt-Zyklen				
Denaturierung	5 s	95	40	Nein
Annealing/Extension	30 s	58		Green (FAM), Yellow (VIC) und Red (Cy5)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	NEC											
D	Sample 1											
E	Sample 2											
F	Sample 3											
G	...											
H												

Abbildung 3. Beispielhafte Plattenanordnung auf dem ABI 7500 Fast Dx

Ergebnisse

Auf dem RGQ MDx 5plex HRM werden die Daten mit der Rotor-Gene Q Software ab Version 2.3.1 gemäß den Anweisungen des Herstellers ausgewertet (Rotor-Gene Q MDx Bedienungsanleitung, Revision 7, September 2018). Die folgenden Analyseparameter sind erforderlich, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Analysen zu gewährleisten (Tabelle 8).

Tabelle 8. Analyseparameter für den RGQ MDx 5plex HRM

Kanäle	Green	Red	Yellow
Fluoreszenzschwelle	0,03	0,03	0,03
Steigungskorrektur	Ja	Ja	Ja
Dynamisches Röhrchen	Ja	Ja	Ja
Ausgangspunkt	Nein	10–20	10–20
Ausreißer entfernen: Reaktionseffizienzschnellenwert	Ja Aktiviert 0 %	Nein	Nein
Gelöschte erste Zyklen	5	5	5
Cut-off-Zyklen	Ct >38,00 wird als 40,00 betrachtet	Nein	Ct >35,00 wird als 40,00 betrachtet

In der Software des RGQ stehen Ergebnisse in der Quantifizierungsergebnistabelle zur Verfügung, die während der Analysen geöffnet ist. Die Daten der ausgewählten Proben werden in der Tabelle zusammengefasst und können als Excel®-Datei exportiert werden, indem Sie mit der rechten Maustaste in das Raster klicken und **Export to Excel** (Nach Excel exportieren) wählen. Vergewissern Sie sich vor dem Export der Ergebnisse, dass alle Proben ausgewählt sind.

Auf dem ABI werden die Daten mit der 7500 Fast System Software ab Version 1.4.1 gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Die folgenden Parameter sind erforderlich, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Analysen zu gewährleisten (Tabelle 9).

Tabelle 9. Analyseparameter für den ABI 7500 Fast Dx

Kanäle	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Passivfarbstoff	ROX	ROX	ROX
Fluoreszenzschwelle	0,13	0,05	0,025
Basislinieneinstellung	Auto	Auto	Auto
Cut-off-Zyklen	Ct >39,00 wird als 40,00 betrachtet	Nein	Ct >35,00 wird als 40,00 betrachtet

* FAM = Filter A/1 für ABI-Plattform, VIC/HEX = Filter B/2 für ABI-Plattform, Cy5/Atto = Filter E/5 für ABI-Plattform

In der ABI SDS Software sind die Ct-Werte einer ausgewählten Gruppe von Wells oder der gesamten Platte im Blatt **Report** (Bericht) des Hauptbereichs **Results** (Ergebnisse) verfügbar. Die Daten können im Format „durch Komma getrennte Werte“ (.csv) gespeichert werden (empfohlen): Wählen Sie im Fenster der SDS Software **File** (Datei) > **Export** (Exportieren) > **Results** (Ergebnisse) (Menüpunkt **Ct** kann auch gewählt werden). Wählen Sie für das Format der exportierten Datei „.csv“.

Interpretation der Ergebnisse

Die Positivkontrolle (Positive Control, PC) sowie die N1- und N2-Gene werden auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Green“ detektiert (oder im Fluoreszenzkanal FAM auf dem ABI).

Die Probenkontrolle, bestehend aus RNase P, wird auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Yellow“ detektiert (oder im Fluoreszenzkanal VIC/HEX auf dem ABI). Für jede klinische Probe sollte eine Amplifikation der Probenkontrolle erfolgen. Bei der PC kann trotz des Fehlens menschlicher Sequenzen eine Amplifikation im gelben Kanal beobachtet werden. In diesem Fall kann ein Signal für die PC im gelben Kanal ignoriert werden, da das starke Fluoreszenzsignal im grünen Kanal in den gelben Kanal übergehen kann.

Die interne Kontrolle (Internal Control, IC) ist in den SARS-CoV-2 Amp-Primern enthalten. Die Detektion der Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC), der Kontrolle ohne Extraktion (No Extraction Control, NEC), der Positivkontrolle (Positive Control, PC) und der klinischen Proben erfolgt auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Red“ (oder im Fluoreszenzkanal Cy5/Atto auf dem ABI).

Um die RT-PCR-Läufe zu validieren, müssen die PC-, NTC- und NEC-Kontrollen wie erwartet amplifiziert und detektiert werden.

Tabelle 10. Laufvalidierungskriterien und Ergebnisinterpretation für den RGQ MDx 5plex HRM

Kontrolle	Detektion im Kanal „Green“	Detektion im Kanal „Yellow“	Detektion im Kanal „Red“	Interpretation
Positivkontrolle (PC)	Ct ≤ 38,00	Indifferent	Indifferent	Lauf ist validiert.
	Ct > 38,00 oder Kein Ct	Indifferent	Indifferent	Lauf ist nicht validiert.
Kontrolle ohne Template (NTC) oder Extraktionskontrolle (NEC)	Ct > 38,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	Lauf ist validiert.
	Beliebige andere Kombinationen mit Amplifikation im grünen oder gelben Kanal		Indifferent	Lauf ist nicht validiert.

Tabelle 11. Laufvalidierungskriterien und Ergebnisinterpretation für den ABI 7500 Fast Dx

Kontrolle	Detektion im FAM-Farbstoff*	Detektion im VIC/HEX-Farbstoff*	Detektion im Cy5/Atto-Farbstoff*	Interpretation
Positivkontrolle (PC)	Ct ≤ 39,00	Indifferent	Indifferent	Lauf ist validiert.
	Ct > 39,00 oder Kein Ct	Indifferent	Indifferent	Lauf ist nicht validiert.
Kontrolle ohne Template (NTC) oder Extraktionskontrolle (NEC)	Ct > 39,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	Lauf ist validiert.
	Alle anderen Kombinationen mit Amplifikation in FAM oder VIC/HEX		Indifferent	Lauf ist nicht validiert.

* FAM = Filter A/1 für ABI-Plattform, VIC/HEX = Filter B/2 für ABI-Plattform, Cy5/Atto = Filter E/5 für ABI-Plattform

Um die getesteten Proben zu validieren, müssen die Proben erwartungsgemäß amplifiziert und detektiert werden.

Tabelle 12. Probenvalidierungskriterien und Ergebnisinterpretation für den RGQ MDx 5plex HRM

Detektion im Kanal „Green“	Detektion im Kanal „Yellow“	Detektion im Kanal „Red“	Interpretation
Ct ≤ 38,00	Indifferent	Indifferent	Probe ist positiv für SARS-CoV-2-RNA.
Ct > 38,00 oder Kein Ct	Ct ≤ 35,00	Indifferent	Probe ist negativ, SARS-CoV-2-RNA wird nicht nachgewiesen.
Ct > 38,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	Ungültige Probe. Kein oder zu wenig Humanmaterial erkannt. Erneute Probeentnahme erforderlich.
Ct > 38,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Nein	Ungültige Probe. RT-qPCR-Reaktion ist inhibiert. Wiederholungstest erforderlich.

Tabelle 13. Probenvalidierungskriterien und Ergebnisinterpretation für den ABI 7500 Fast Dx

Detektion im FAM-Farbstoff*	Detektion im VIC/HEX-Farbstoff*	Detektion im Cy5/Atto-Farbstoff*	Interpretation
Ct ≤ 39,00	Indifferent	Indifferent	Probe ist positiv.
Ct > 39,00 oder Kein Ct	Ct ≤ 35,00	Indifferent	Probe ist negativ, SARS-CoV-2 wird nicht nachgewiesen.
Ct > 39,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	Ungültige Probe. Kein Humanmaterial erkannt. Erneute Probeentnahme erforderlich.
Ct > 39,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Nein	Ungültige Probe. RT-qPCR-Reaktion ist inhibiert. Wiederholungstest erforderlich.

* FAM = Filter A/1 für ABI-Plattform, VIC/HEX = Filter B/2 für ABI-Plattform, Cy5/Atto = Filter E/5 für ABI-Plattform

Anwendungseinschränkungen

- Für *in-vitro*-diagnostische Anwendungen.
- Die Ergebnisse des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit sind nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose, Behandlung oder andere Entscheidungen des Patientenmanagements vorgesehen. Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und sollten nicht die alleinige Grundlage für eine Entscheidung zur Behandlung des Patienten bilden.
- Das Produkt ist zur Verwendung durch Personal vorgesehen, das speziell in *in-vitro*-diagnostischen Verfahren unterrichtet und geschult wurde.
- Für optimale PCR-Ergebnisse ist die strikte Einhaltung der Gebrauchsanweisung der qPCR-Plattform (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx oder ABI 7500 Fast Dx) erforderlich.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.

Leistung

Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der $\geq 95\%$ der getesteten Proben ein positives Ergebnis liefern.

Die LoD wurde durch die Analyse serieller Verdünnungen negativer nasopharyngealer Abstrichproben bestimmt, die mit hochtitrigen Stämmen inaktivierter Viruspartikel von kommerziellen Anbietern (ZeptoMetrix®) hergestellt wurden. Um die ermittelte LoD-Konzentration zu bestätigen, muss die Detektionsrate aller Wiederholungen $\geq 95\%$ sein (mindestens 19/20 Wiederholungen müssen ein positives Signal erzeugen). Die LoD-Konzentration wurde auf beiden angegebenen Real-time PCR-Plattformen unter Verwendung von zwei verschiedenen Reagenzchargen bestätigt.

Die angegebene Nachweisgrenze für das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit liegt auf beiden Real-time PCR-Plattformen bei 950 cp/ml.

Analytische Spezifitätsstudien (Inklusivität und Exklusivität/Kreuzreaktivität)

Inklusivität

Die Inklusivität der *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes wurde mit einer *In-silico*-Analyse der in der GISAID-Datenbank (www.gisaid.org) verfügbaren Sequenzen bewertet. Insgesamt wurden 722.488 Sequenzen (Stand 23.03.2021) von COVID CG (<https://covidcg.org>) analysiert, ergänzt durch GISAID-Metadaten. Die Sequenzen wurden mit der WIV04-Referenzsequenz aligniert (zu 100 % identisch mit Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, mit Ausnahme der Länge des Poly-A-Schwanzes) und die Einzelnukleotid-Varianten (Single Nucleotide Variations, SNVs) wurden in der genomischen Zielregion der *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Primers and Probes analysiert. Die Prävalenz der identifizierten SNVs blieb unter 1 %, ebenso wie die Häufigkeit der gleichzeitig auftretenden Mutationen. Kein SNV wurde an den letzten 1 bis 3 Nukleotiden vom 3'-Ende in den jeweiligen Oligonukleotiden lokalisiert, wodurch eine Auswirkung auf die Leistung erwartet wird. Es wird davon ausgegangen, dass das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit in der Lage ist, 100 % der veröffentlichten Sequenzen nachzuweisen.

Exklusivität/Kreuzreaktivität

In-silico-Analyse

Die Exklusivität der *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes wurde mit einer *In-silico*-Analyse der in der NCBI-Datenbank verfügbaren Sequenzen bewertet. Die *In-silico*-Analyse zeigte, dass einige der getesteten Pathogene eine Homologie von mehr als 80 % mit einem der *artus* SARS-CoV-2 Primern oder Sonden aufweisen. Dazu gehören *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* hatte weniger als 80 % Homologie mit einem der Primer/Sonden des SARS-CoV-2-Assays. Die *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes zeigten jedoch keine mögliche Amplifikation mit den verschiedenen Sequenzen aus der NCBI nr/nt Datenbank.

Insgesamt wurden 36 Bakterien-, Viren- und Pilzstämmen mittels *In-silico*-PCR mit einer begrenzten möglichen Amplifikatgröße von 500 bp analysiert. Die Pathogen-Sequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank, jedoch zeigte keiner dieser Pathogene eine Amplifikation *in silico*.

Tabelle 14. Liste der *in silico* getesteten Pathogene.

Pathogene	Stamm/Typ	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> -PCR-Ergebnisse
<i>Adenovirus Typ 3</i>	Typ 3	45659	Keine Übereinstimmung
<i>Adenovirus Typ 4</i>	Typ 4	28280	Keine Übereinstimmung
<i>Adenovirus Typ 5</i>	Typ 5	28285	Keine Übereinstimmung
<i>Adenovirus Typ 7A</i>	Typ 7A	85755	Keine Übereinstimmung
<i>Adenovirus Typ 14</i>	Typ 14	10521	Keine Übereinstimmung
<i>Adenovirus Typ 31</i>	Typ 31	10529	Keine Übereinstimmung
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Keine Übereinstimmung
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Keine mögliche Amplifikation*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL029 TW-183	115713	Keine Übereinstimmung
Enterovirus	Typ 68	42789	Keine Übereinstimmung

* Sequenzübereinstimmung mit einem der Primer/Sonden zeigte eine Homologie von <80 %.

† Sequenzübereinstimmung mit einem der Primer/Sonden zeigte eine Homologie ≥ 80 %.

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 14 (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Pathogene	Stamm/Typ	Taxonomie-ID	In-silico-PCR-Ergebnisse
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Keine Übereinstimmung
Humanes Coronavirus	229E	11137	Keine Übereinstimmung
Humanes Coronavirus	NL63	277944	Keine Übereinstimmung
Humanes Coronavirus	HKU-1	290028	Keine Übereinstimmung
Humanes Coronavirus OC43	OC43	31631	Keine Übereinstimmung
Humanes Coronavirus	MERS-CoV	1335626	Keine Übereinstimmung
Humanes Metapneumovirus	k. A.	162145	Keine Übereinstimmung
Influenza A	H1N1	114727	Keine Übereinstimmung
Influenza A	H3N2	119210	Keine Übereinstimmung
Influenza B	k. A.	11520	Keine Übereinstimmung
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Keine Übereinstimmung
Parainfluenza-Virus	Typ 1	12730	Keine Übereinstimmung
Parainfluenza-Virus	Typ 2	2560525	Keine Übereinstimmung
Parainfluenza-Virus	Typ 3	11216	Keine Übereinstimmung
Parainfluenza-Virus	Typ 4	2560526	Keine Übereinstimmung
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Keine Übereinstimmung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Keine mögliche Amplifikation*
Respiratorisches Synzytial-Virus	Typ A (RSV-A)	208893	Keine Übereinstimmung
Respiratorisches Synzytial-Virus	Typ B (RSV-B)	208895	Keine Übereinstimmung
Rhinovirus	Typ A	147711	Keine Übereinstimmung
Rhinovirus	Typ B	147712	Keine Übereinstimmung
SARS-Coronavirus	Tor2	694009	Keine mögliche Amplifikation†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	k. A.	1282	Keine Übereinstimmung
<i>Streptococcus pyogenes</i>	k. A.	1314	Keine mögliche Amplifikation†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Keine mögliche Amplifikation†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Keine Übereinstimmung

* Sequenzübereinstimmung mit einem der Primer/Sonden zeigte eine Homologie von <80 %.

† Sequenzübereinstimmung mit einem der Primer/Sonden zeigte eine Homologie ≥ 80 %.

In-vitro-Analyse

Die Kreuzreaktivität wurde *in vitro* mit Pathogenen verifiziert, die in der In-silico-Analyse eine Homologie von $\geq 80\%$ mit den SARS-CoV-2-Amp Primern aufwiesen. Die Proben wurden vorbereitet, indem die Matrix der nasopharyngealen Abstriche mit potenziell kreuzreaktiven Organismen bei 10^6 cp/ml versetzt wurde, mit Ausnahme von SARS-CoV-1, das gemäß der Empfehlung des Lieferanten unverdünnt getestet wurde. Keines dieser Pathogene zeigte *in vitro* Kreuzreaktivität.

Die mikrobiell bedingte Störung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Assays wurde *in vitro* an einer Reihe von empfohlenen Pathogenen bewertet. Die Proben wurden vorbereitet, indem maximal 5 Pathogene in negative nasopharyngeale Abstriche mit inaktivierten SARS-CoV-2-Partikeln (Zeptomatrix) mit einer Konzentration von $2,87 \times \text{LoD}$ zugegeben wurden, und zwar bei 105 TCID50/ml für virale Ziele, bei 10^6 cp/ml für bakterielle und fungale Ziele, oder bei der höchstmöglichen Konzentration auf Basis der Stammkonzentration. Die NATrol™ Panels und SARS-CoV-1 wurden direkt mit inaktivierten SARS-CoV-2-Viruspartikeln (Zeptomatrix) mit einer Konzentration von $2,87 \times \text{LoD}$ versetzt. Die Ergebnisse für jeden getesteten Mikroorganismen-Pool und die jeweiligen Konzentrationen sind unten zusammengefasst.

Tabelle 15. Liste der *in vitro* getesteten Pathogene bei mikrobiell bedingten Störungen.

Pool-ID/ Proben-ID	Mikroorganismus	Quelle	Endkonzentration	Einheit	Ergebnis
Pool 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Humanes Coronavirus 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1.43E+05	TCID50/ml	
	Humanes Coronavirus OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5.86E+04	TCID50/ml	
	Humanes Coronavirus NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2.84E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1.43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluenza-Virus 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9.14E+06	TCID50/ml	
Pool 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Adenovirus T31	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1.67E+04	TCID50/ml	
	Parainfluenza-Virus 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4.29E+04	TCID50/ml	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1.43E+05	TCID50/ml	
	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2.86E+04	TCID50/ml	

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 15 (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Pool-ID/ Proben-ID	Mikroorganismus	Quelle	Endkonzentration	Einheit	Ergebnis
Pool 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Parainfluenza-Virus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1.43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1.00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3.30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1.00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4.60E+06	CFU/ml	
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Adenovirus T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1.02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1.00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1.00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1.00E+07	CFU/ml	
Pool 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Respiratorisches Synzytial- Virus RSVA	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7.14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1.43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus Typ 68 Hauptgruppe	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1.43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2.86E+04	TCID50/ml	
Pool 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	MERS-Coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1.43E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1.43E+05	TCID50/ml	
	Humanes Metapneumovirus (hMPV) Typ B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7.14E+03	TCID50/ml	
	Respiratorisches Synzytial- Virus Typ B (RSV-B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1.43E+03	TCID50/ml	

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 15 (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Pool-ID/ Proben-ID	Mikroorganismus	Quelle	Endkonzentration	Einheit	Ergebnis
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6.43E+05	TCID50/ml	
	Parainfluenza-Virus 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7.14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H3N2 Schweiz/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2.86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1.00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	NATrol Panel RP1 (Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/2009), Rhinovirus (Typ 1A), Adenovirus T3, Parainfluenza T1, Parainfluenzavirus T4, Metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (Typ A1)	Zeptomatrix (MDZ001)	Unbekannt*	k. A.	
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	NATrol Panel RP2 (Influenza A H1 (Neukaledonien/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenza T2, Parainfluenza T3, Coronavirus HKU rekombinant, Coronaviren (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639)	Zeptomatrix (MDZ001)	Unbekannt*	k. A.	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	cp/ml	Keine Interferenz
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Unbekannt*	k. A.	

* Konzentration wird vom Lieferanten nicht mitgeteilt.

Störsubstanzen

Die Auswirkung von mutmaßlichen Störsubstanzen (für die in Tabelle 16 aufgeführten Substanzen) auf die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wurde bewertet. Die Tests wurden an 3 Pools negativer nasopharyngealer Abstriche und an 3 Pools positiver nasopharyngealer Abstriche durchgeführt, die mit inaktivierten SARS-CoV-2-Viruspartikeln (Zeptomatrix) mit einer Konzentration von 4 x LoD versetzt wurden. Die Experimente wurden auf der RGQ MDx 5plex HRM-Plattform (auf 4 Geräten) von 1 Bediener mit 1 Pilot-Kit durchgeführt.

Jeder Pool wurde in 2 geteilt, um entweder die in einem Lösungsmittel gelöste Störsubstanz (Testprobe) oder das Lösungsmittel allein (Kontrollprobe) zu testen. Die Trefferquoten im grünen und roten Fluoreszenzkanal wurden zwischen dem Test und den entsprechenden Kontrollproben verglichen. Bei Abwesenheit von Störungen haben der Test und die zugehörigen Kontrollproben die gleiche Trefferquote.

Tabelle 16 zeigt, dass keine der getesteten Substanzen die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im grünen Fluoreszenzkanal beeinträchtigt.

Tabelle 16. Liste der Störsubstanzen.

Störsubstanzen	Funktion	Getestete Konzentration	Ergebnis ist ein negativer nasopharyngealer Abstrich	Ergebnis ist ein positiver nasopharyngealer Abstrich (4 x LoD)
Tobramycin	Systemisches Antibiotikum	1 mg/ml	Keine Störung 0/15	Keine Störung 0/15
Mupirocin	Antibiotische Nasensalbe	6,6 mg/ml	Keine Störung 0/15	Keine Störung 0/15
Fluticason	Nasales Kortikosteroid	5 % (v/v)	Keine Störung 0/15	Keine Störung 0/15
Menthol (Halstabletten)	Orales Anästhetikum und Analgetikum	0,5 mg/ml	Keine Störung 0/15	Keine Störung 0/15

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 16. (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Störsubstanzen	Funktion	Getestete Konzentration	Ergebnis ist ein negativer nasopharyngealer Abstrich	Ergebnis ist ein positiver nasopharyngealer Abstrich (4 x LoD)
Oxymetazolin	Nasenspray	10 % (v/v)	Keine Störung (0/15)	Keine Störung (0/15)
Oseltamivir	Antivirales Medikament	3,3 mg/ml	Keine Störung (0/15)	Keine Störung (0/15)
Mucin (Rinder-Submaxillardrüse Typ I-5)		2,5 mg/ml	Keine Störung (0/15)	Keine Störung (0/15)
Vollblut		4 % (v/v)	Keine Störung (1/15*)	Keine Störung (0/15)

* Es wurde eine Amplifikation erkannt, die einem Artefakt entspricht.

Präzision

Die Präzisionsstudie bewertete die Reproduzierbarkeit (dieselbe Probe wird in verschiedenen Läufen und unter verschiedenen Bedingungen wiederholt: 5 Tage, 3 Kit-Chargen, 3 Bediener und 2 Geräte) und die Wiederholbarkeit (die gleiche Probe wird im gleichen Lauf und unter den gleichen Bedingungen wiederholt). Die Tests erfolgten auf dem RGQ MDx mit negativen nasopharyngealen Proben und negativen nasopharyngealen Proben, versetzt mit einer Konzentration von 5 x LoD.

Für jede Verdünnungsstufe wurden 204 Datenpunkte erfasst. Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsdaten wurden verwendet, um die Standardabweichung (Standard Deviation, SD) und den Variationskoeffizienten (Coefficient of Variation, %CV) für die SARS-CoV-2-Ziele im grünen, gelben und roten Kanal zu bestimmen. Tabelle 17 zeigt, dass das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit eine Gesamtpräzision von 0,63 SD (2,03 %CV) im grünen Kanal, von 0,54 SD (2,22 %CV) im gelben Kanal und von 1,28 SD (4,10 %CV) im roten Kanal aufweist.

Tabelle 17. Standardabweichung und Variationskoeffizient des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Proben und Detektionskanal	Insgesamt	Tag-zu-Tag	Charge-zu-Charge	Bediener-zu-Bediener	Instrument-zu-Instrument	Lauf-zu-Lauf	Innerhalb des Laufs
Standardabweichung (Standard Deviation, SD) (Variationskoeffizient [Coefficient of Variation, %CV])							
Negative nasopharyngeale Abstrichprobe Kanal „Yellow“	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
Negative nasopharyngeale Abstrichprobe Kanal „Red“	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
Gespikete nasopharyngeale Abstrichprobe Kanal „Green“	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
Gespikete nasopharyngeale Abstrichprobe Kanal „Yellow“	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
Gespikete nasopharyngeale Abstrichprobe Kanal „Red“	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Klinische Leistungsmerkmale

Die klinischen Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp Assays wurde anhand von retrospektiven nasopharyngealen Abstrichproben in Transportmedium bewertet, bestehend aus:

- 98 SARS-CoV-2-RNA-negativen Proben
- 52 SARS-CoV-2-RNA-positiven Proben

Alle Proben wurden von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer COVID-19-Infektion entnommen und bis zur Verwendung gefroren gelagert.

Die klinische Validierung wurde mit dem ABI 7500 Fast Dx durchgeführt. Tabelle 18 zeigt die Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode, ausgedrückt als prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) und als prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabelle 18. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode

Probentyp	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negativ	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Abweichende Ergebnisse wurden mit einer dritten Methode ausgewertet und anhand einer Kontingenztafel neu analysiert. Die Gesamtergebnisse für die klinischen Leistungsmerkmale werden als prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) und prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) ausgedrückt und sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Probentyp	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negativ	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Nachstehend sind der Anteil der übereinstimmenden Proben sowie die prozentuale positive und negative Übereinstimmung (PPA bzw. NPA) mit den erwarteten Probenzuständen aufgeführt:

Prozentuale positive Übereinstimmung
(Positive Percent Agreement, PPA%): $51/52 = 98,1\%$ (95%-KI: 89,9 %–99,7 %)

Prozentuale negative Übereinstimmung
(Negative Percent Agreement, NPA%): $93/98 = 94,9\%$ (95%-KI: 88,6 %–97,8 %)

Klinische Leistungsmerkmale, einschließlich asymptomatischer Personen

Die klinischen Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp Assays wurde anhand von retrospektiven nasopharyngealen Abstrichproben in Transportmedium bewertet, bestehend aus:

- 100 SARS-CoV-2-RNA-negativen Proben
- 53 SARS-CoV-2-RNA-positiven Proben

Alle Proben wurden Patienten ohne Symptome oder sonstige Hinweise, die den Verdacht auf eine COVID-19-Infektion begründen, entnommen.

Die klinische Validierung wurde mit dem ABI 7500 Fast Dx durchgeführt. Sechzehn Proben wurden nach dem Test mit dem *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit aufgrund des Status „ungültig“ gemäß den Probenvaliditätskriterien von der Analyse ausgeschlossen (Tabelle 13).

Tabelle 20 zeigt die Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode, ausgedrückt als prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) und prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabelle 20. Klinische Leistungsmerkmale des artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode

Probentyp	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	1,15 (1/87)	–
Negativ	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Neunzehn abweichende Ergebnisse wurden mit einer dritten Methode untersucht und anhand einer Kontingenztabelle neu analysiert. Die Gesamtergebnisse für die klinischen Leistungsmerkmale werden als prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) und prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) ausgedrückt und sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21. Klinische Leistungsmerkmale des artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Probentyp	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0,95 (1/105)	–
Negativ	105	–	–	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Achtzehn falsch negative Proben wurden neu als richtig negativ eingestuft, während eine falsch positive Probe falsch positiv blieb.

Nachstehend sind der Anteil der übereinstimmenden Proben sowie die prozentuale positive und negative Übereinstimmung (PPA bzw. NPA) mit den erwarteten Probenzuständen aufgeführt:

Prozentuale positive Übereinstimmung

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (95%-KI: 89,3 %–100,0 %)

Prozentuale negative Übereinstimmung

(Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = 99,05\%$ (95%-KI: 94,8 %–99,8 %)

Literatur

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch auf der Seite „Frequently Asked Questions“ (Häufig gestellte Fragen) unseres Support-Centers unter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Kommentare und Vorschläge

Schwaches oder kein Signal im Kanal „Green“ (FAM) für die Positivkontrolle (Positive Control, PC)

- | | |
|--|---|
| a) Der ausgewählte Fluoreszenzkanal für die RT-PCR-Datenanalyse entspricht nicht dem Protokoll. | Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluoreszenzkanal FAM (Grün) für die analytischen SARS-CoV-2-RT-PCR-Ziele, den Fluoreszenzkanal HEX/VIC/JOE (Gelb) für die Probenkontrolle und Cy5/Atto (Rot) für die interne Kontrolle aus. |
| b) Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils. | Vergleichen Sie das RT-PCR-Programm mit den Angaben im Protokoll. |
| c) Fehlerhafte Konfiguration der PCR-Reaktion. | Verifizieren Sie Ihre Arbeitsschritte anhand des Pipettierschemas und wiederholen Sie ggf. die PCR. |
| d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponente(n) entsprachen nicht den in Anweisungen oder das Verfallsdatum des <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kits ist überschritten. | Beachten Sie die Lagerungsbedingungen und Verfallsdaten der Reagenzien und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. |
| e) Fehlerhafte Konfiguration der qPCR-Plattform während der Datenkonfiguration. | Wenden Sie die für Ihre qPCR-Plattform geltenden empfohlenen Konfigurationen an, die in diesem Handbuch beschrieben sind. |
| f) Die PCR wurde inhibiert. | Orientieren Sie sich an der guten Praxis für Molekularbiologie-Labore, um die Einschleppung von Kontaminanten zu vermeiden. Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Befolgen Sie das in diesem Handbuch beschriebene Protokoll. Überprüfen Sie das Verfallsdatum des Reagenzes (siehe Etikett), und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit. Wiederholen Sie den Assay mit einer anderen Probe. |

Signal im Kanal „Green“ (FAM) in der Kontrolle ohne Template oder Extraktionskontrolle

Während der Vorbereitung der RT-PCR-Platte ist es zur Kontamination mit SARS-CoV-2-Sequenzen gekommen.

Wiederholen Sie die RT-PCR mit neuen Reagenzien. Orientieren Sie sich an der guten Praxis für Molekularbiologie-Labore, um die Einschleppung von Kontaminanten zu vermeiden. Befolgen Sie das in diesem Handbuch beschriebene Protokoll. Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Kommentare und Vorschläge

Schwaches oder kein rotes Signal (Cy5/Atto) von der internen Kontrolle















- a) Eine Störsubstanz wurde in die RT-PCR-Reaktion eingeschleppt. Die PCR-Reaktion wurde inhibiert.
- Orientieren Sie sich an der guten Praxis für Molekularbiologie-Labore, um die Einschleppung von Kontaminanten zu vermeiden.
- Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Befolgen Sie das in diesem Handbuch beschriebene Protokoll.
- Wiederholen Sie das Experiment mit einer neu entnommenen Probe.
- b) Die interne Kontrolle hat sich zersetzt.
- Orientieren Sie sich an der guten Praxis für Molekularbiologie-Labore, um die Einschleppung von RNasen zu vermeiden. Befolgen Sie die in diesem Handbuch beschriebenen Empfehlungen.
- Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und Geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Beachten Sie die Lagerungsbedingungen und Verfallsdaten der Reagenzien und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit.
- c) Fehlerhafte Konfiguration der qPCR-Plattform während der Datenkonfiguration.
- Wenden Sie die für Ihre qPCR-Plattform geltenden empfohlenen Konfigurationen an, die in diesem Handbuch beschrieben sind.

Schwaches oder kein gelbes Signal (VIC/HEX) der Probenkontrolle

- a) Die klinische Probe hat sich zersetzt.
- Befolgen Sie für Lagerung, Handhabung und Transport der Proben die Empfehlungen des Herstellers der Entnahmevorrichtung.
- Befolgen Sie das in diesem Handbuch beschriebene Protokoll einschließlich der Probenvorbereitungsschritte mit dem SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Halten Sie die Lagerungsbedingungen ein, überprüfen Sie die Verfallsdaten der Reagenzien, z. B. für den SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, und verwenden Sie bei Bedarf ein neues Kit.
- b) Die Probe wurde nicht korrekt entnommen. Es wurden nicht ausreichend menschliche Zellen auf dem Tupfer gesammelt oder in das Transportmedium überführt.
- Befolgen Sie für Entnahme und Handhabung der Proben die Empfehlungen des Herstellers der Entnahmevorrichtung.
- c) Fehlerhafte Konfiguration der qPCR-Plattform während der Datenkonfiguration.
- Wenden Sie die für Ihre qPCR-Plattform geltenden Konfigurationen an, die in diesem Handbuch beschrieben sind.

Symbole

In der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole verwendet werden:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Inhalt ausreichend für 768 oder 3072 Reaktionen
	Verwendbar bis
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vor Sonneneinstrahlung schützen
	Warnung/Vorsicht

Kontakt

Für technische Hinweise und weitere Informationen wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von QIAGEN **support.qiagen.com**.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Für 768 Reaktionen: Vorbereitungspuffer, ROX-Farbstoff, Master-Mix, Primer und Sonden, interne Kontrolle, Wasser (NTC) und Positivkontrolle	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Für 3072 Reaktionen: Vorbereitungspuffer, ROX-Farbstoff, Master-Mix, Primer und Sonden, interne Kontrolle, Wasser (NTC) und Positivkontrolle	4511469
Gerät und Zubehör		
PCR Tubes, 0.1 ml für Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Zur Verwendung mit 72-Well Rotor, Röhrchenstreifen und Deckeln	981103
Rotor-Gene Q Software	Rotor-Gene Q Software v2.3.1 (oder höher)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Real-time PCR Thermocycler mit 5 Kanälen, HRM-Analysator, Software, Laptop und Zubehör; 1 Jahr Garantie auf Teile und Arbeit, Installation	9002032
Loading Block	72 x 0,1-ml-Röhrchen	9018901

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Haftungsausschlüsse finden Sie im Handbuch oder Benutzerhandbuch des jeweiligen QIAGEN-Kits. Handbücher und Benutzerhandbücher zu QIAGEN-Kits sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Revision	Beschreibung
R1, April 2021	Erstversion.
R2, Juli 2021	<p>Anwendungserweiterung: Der Test wurde für asymptomatische Personen etabliert. Der Verwendungszweck wurde durch den Einschluss von Personen ohne Symptome oder sonstige Hinweise, die den Verdacht auf eine COVID-19-Infektion begründen, aktualisiert. Der Abschnitt über Klinische Leistungsmerkmale, einschließlich asymptomatischer Personen wurde den Daten zur Leistung hinzugefügt.</p> <p>Der Hinweis „Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden nicht für Patienten ohne Anzeichen und Symptome einer Atemwegsinfektion bestimmt“ im Abschnitt Anwendungseinschränkungen wurde entfernt.</p> <p>Kleinere redaktionelle und Formatierungsänderungen.</p>

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit*

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Benutzern für andere QIAGEN-Benutzer zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückerfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® [American Type Culture Collection]; Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® [Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc]; ZepTometrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® [Microsoft Corporation]; ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® [Thermo Fisher Scientific oder seine Tochtergesellschaften]. Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com