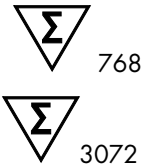


September 2021

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



Version 1



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen auf
Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM, ABI[®] 7500 Fast Dx,
QuantStudio[®] 5 Dx, cobas[®] z 480 oder CFX96[™] Dx Geräten



4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden, DEUTSCHLAND

R3

Inhalt

Verwendungszweck	4
Beschreibung und Prinzip	5
Angaben zum Pathogen	5
Zusammenfassung und Erläuterung	6
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	10
Kit-Inhalt	10
Kitkomponenten	11
Plattformen und Software	12
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	13
Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung	13
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	15
Sicherheitshinweise	15
Vorsichtsmaßnahmen	16
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	17
Probentransport, -lagerung und -handhabung	17
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem RGQ MDx 5plex HRM	19
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem ABI 7500 Fast Dx 25	
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem CFX96 Dx	31
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem cobas z 480	37
Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem QuantStudio 5 Dx	
Ergebnisse	49

Analyse auf dem RGQ MDx 5plex HRM	49
Analyse auf dem ABI 7500 Fast Dx.....	51
Analyse auf dem CFX96 Dx.....	51
Analyse auf dem cobas z 480	53
Analyse auf dem QuantStudio 5 Dx.....	56
Interpretation der Ergebnisse.....	57
Anwendungseinschränkungen	60
Leistung	61
Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)	61
Analytische Spezifitätsstudien (Inklusivität und Exklusivität/Kreuzreaktivität)	62
Präzision	75
Klinische Leistungsmerkmale	76
Literatur	81
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	82
Symbole	84
Kontakt.....	86
Bestellinformationen	87
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	88

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 Swabs, 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. Bei Verwendung unverdünnter Speichelproben eignet sich der Test für Personen mit Anzeichen und Symptomen einer Infektionen oder bei denen der Verdacht auf COVID-19 besteht.

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 RT-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 MDx System, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 5 Dx, cobas z 480 oder CFX96 Dx als Real-time PCR-Systeme vorgesehen.

Beschreibung und Prinzip

Angaben zum Pathogen

Bei den Coronaviren, einer Gattung der Familie der *Coronaviridae*, handelt es sich um große behüllte positivsträngige 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 von SARS-CoV (1, 3), das für den Ausbruch im Jahr 2003 verantwortlich war, sowie von MERS-CoV, das seit 2012 im Nahen Osten zirkuliert. SARS-CoV-2 ist der Erreger der Krankheit COVID-19. 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) sowie in unverdünnten Speichelproben nachweisbar (3).

In Verbindung mit Patientenanamnese und SARS-CoV-2-Epidemiologie sind Real-time 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, Real-time 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).

Das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ist auf 2 Zielsequenzen (N1 und N2) innerhalb des N-Gens ausgerichtet, die im selben Fluoreszenzkanal detektiert werden. Es erfolgt keine Differenzierung zwischen den beiden Zielen, sodass die Amplifikation eines beliebigen dieser zwei Ziele zu einem Fluoreszenzsignal führt. Positive Ergebnisse deuten auf die Gegenwart von SARS-CoV-2 hin, schließen eine Koinfektion mit anderen Pathogenen jedoch nicht aus. Andererseits schließen negative Real-time 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 der Nachweis der SARS-CoV-2-RNA mittels Real-time RT-PCR auf dem RGQ MDx System, dem ABI 7500 Fast Dx, dem CFX96 Dx, dem cobas z 480 oder dem QuantStudio 5 Dx folgt (Abbildung 1).

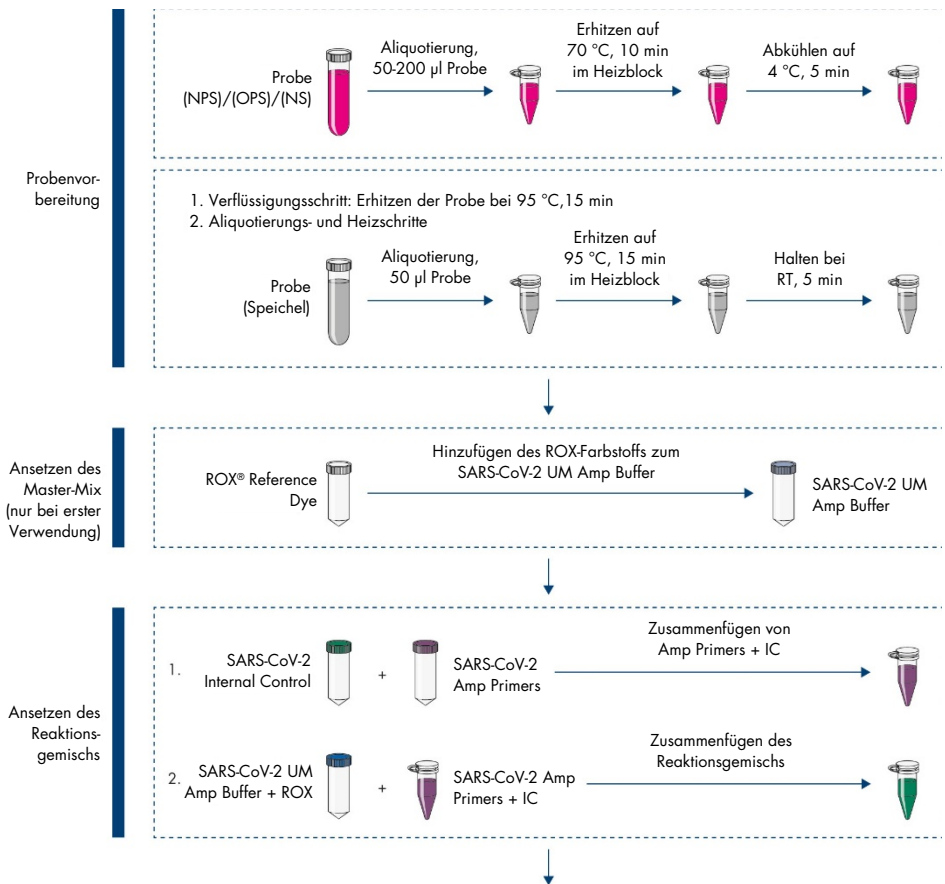
Der SARS-CoV-2 UM Amp Buffer enthält die Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation einer 72-Basenpaar(bp)-Region und einer 67-bp-Region aus dem RNA-Genom von SARS-CoV-2 und für den direkten Nachweis der Amplifikate im Fluoreszenzkanal „Green“ des RGQ MDx Geräts und im Fluoreszenzkanal „FAM“ des ABI 7500 Fast Dx, CFX96, cobas z 480 oder QuantStudio 5 Dx.

Das Primer- und Sondengemisch des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit enthält auch die für die RNase P-Amplifikationen benötigten Oligonukleotide. Ein Nachweis dieser Amplifikationen im Fluoreszenzkanal „Yellow“ des RGQ MDx Geräts oder im Fluoreszenzkanal „VIC/HEX“ des ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 oder QuantStudio 5 Dx bestätigt, dass ausreichend biologische Probe entnommen 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 Inhibition der Real-time RT-PCR. Dies erfolgt über den Nachweis einer internen RNA-Kontrolle (Internal Control, IC) im Fluoreszenzkanal „Red“ des RGQ MDx Geräts oder im Fluoreszenzkanal „Cy5/ATTO647N“ des ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 oder QuantStudio 5 Dx. Da die IC im SARS-CoV-2 Amp Primers Mix enthalten ist, sollte ihre Amplifikation konstant sein, es sei denn, es ist ein Real-time RT-PCR-Inhibitor in der Probe oder in der PCR-Reaktion vorhanden, welcher 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 den Erfolg des PCR-Schritts zu bestätigen. Eine Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC) (Verwendung von SARS-CoV-2 UM Prep Buffer als NEC) wird dringend empfohlen, um die Abwesenheit von Inhibitoren der Real-time RT-PCR im Vorbereitungspuffer zu gewährleisten.

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



(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

(Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

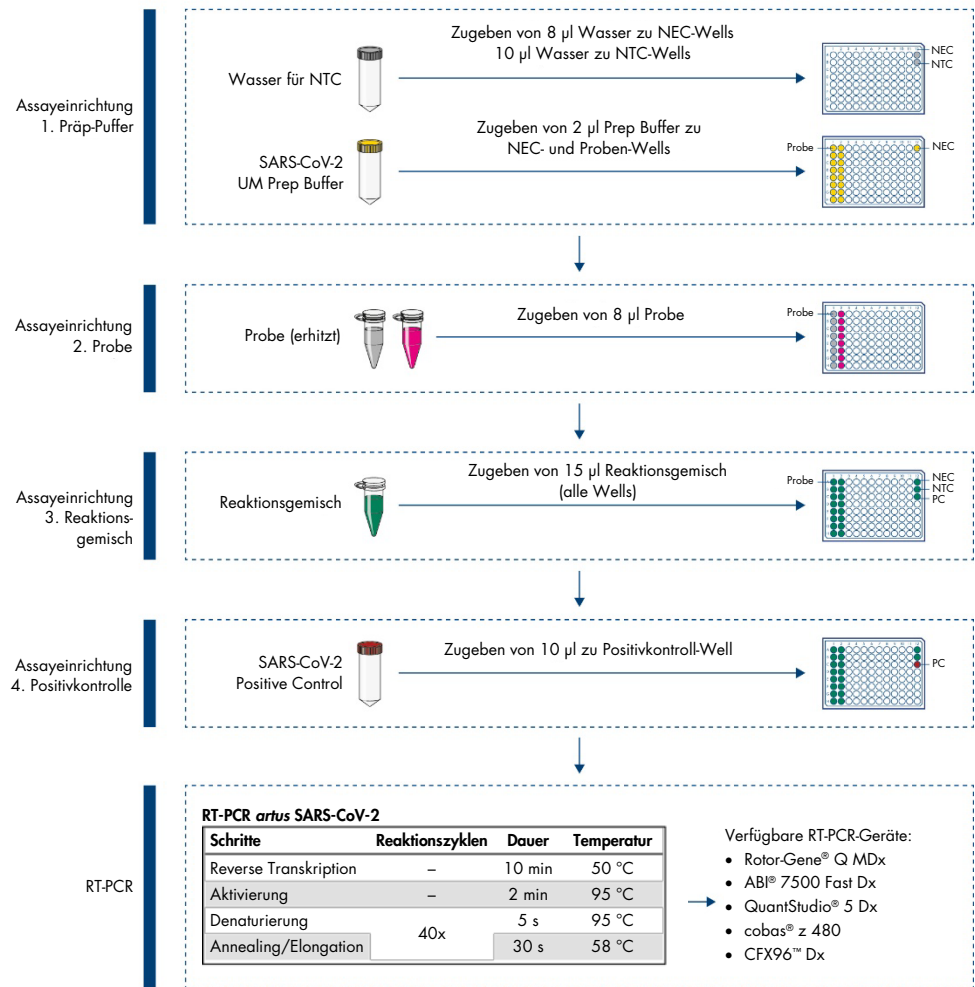


Abbildung 1. Arbeitsablauf des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

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 Effizienz der Real-time RT-PCR.

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): Bei der Positivkontrolle handelt es sich um eine doppelsträngige DNA, die mit SARS-CoV-2 Primers and Probes (P&P Mix) amplifiziert wird. 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 weist das RNase P-Gen nach und ist entscheidend, um das Vorhandensein biologischer Proben im Falle SARS-CoV-2-negativer 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 fünf Arbeitsabläufe verwendet werden, die den Einsatz der folgenden Real-time RT-PCR-Geräte und der 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
- CFX96 Dx mit CFX Manager Dx-Software, Version 3.1.3090.1022 oder höher
- cobas z 480 mit LightCycler® 480 SW UDF, Version 2.0.0 oder höher
- QuantStudio 5 Dx mit QuantStudio 5 Dx IVD-Software, Version 1.0.1 oder höher, und QuantStudio 5 Dx TD-Software, Version 1.0.1 oder höher

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

Häufige Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

- Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsröhrchen
- Pipetten (einstellbar)
- Vortexer
- Heizblock
- Puderfreie Einmal-Laborhandschuhe
- Sterile und nukleasefreie Pipettenspitzen mit Filtern
- PCR-freie 1,5-ml- oder 2-ml-Röhrchen
- 96-Well-Plattenzentrifuge

Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung nach Plattform

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Gerät

- 0,1-ml-PCR-Röhrchen zur Verwendung mit dem Rotor-Gene Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, Kat.-Nr. 981103).
- 72-Well Rotor (Kat.-Nr. 9018903) und Locking Ring 72-Well Rotor (Kat.-Nr. 9018904)

ABI 7500 Fast Dx Gerät

- 96-Well MicroAmp™ (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 4360954)

CFX96 Dx Gerät

- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, niedriges Profil, dünnwandig, mit weißem/durchsichtigem Rahmen (Bio-Rad Laboratories Inc., Kat.-Nr. HSP9601)
- Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film, Adhesive, Optical (Bio-Rad Laboratories Inc., Kat.-Nr. MSB1001).

cobas z 480 Gerät

- LightCycler 480 Multiwell Plate, weiß (Roche Group, Kat.-Nr. 04729692001).
- LightCycler 480 Sealing Foil (Roche Group, Kat.-Nr. 04729757001).

QuantStudio 5 Dx Gerät

- MicroAmp EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. A36924)
- MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, Kat.-Nr. 4360954)

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 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 sowie mit unverdünnten Speichelproben 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.

Entnahme, Transport und Lagerung von nasopharyngealen, nasalen und oropharyngealen Abstrichen

Für die Entnahme, Lagerung und den Transport von Abstrichen beachten Sie bitte die Empfehlungen des Herstellers. Die Abstrichtupfer müssen vollständig in das Transportmedium eingetaucht sein, um die Probenintegrität zu erhalten. Nasopharyngeale Abstrichproben sind unter folgenden Bedingungen lagerfähig und stabil:

- bis zu 72 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- 2 Wochen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Nasopharyngeale Abstrichproben bleiben über 3 Einfrier-/Auftauzyklen stabil.

Entnahme, Transport und Lagerung unverdünnter Speichelproben

Unverdünnte Speichelproben müssen in sterilen Behältern ohne Konservierungsmittel, Puffer oder andere Zusätze aufbewahrt werden.

Anweisungen zur Entnahme unverdünnten Speichels:

- Vor der Speichelentnahme nicht husten.
- In den 30 Minuten vor der Speichelentnahme nicht trinken, essen, rauchen oder vaper, Kaugummi kauen oder Zähne putzen.
- In den 24 Stunden vor der Speichelentnahme darf keine Zahnbehandlung oder -untersuchung erfolgen.

Die unverdünnten Speichelproben sind unter folgenden Bedingungen lagerfähig und stabil:

- bis zu 72 Stunden bei Raumtemperatur (18 bis 26 °C)
- bis zu 72 Stunden bei 4 °C (2 bis 8 °C)
- bis zu 12 Tage kombinierte Lagerung zunächst bei RT, dann 4 °C, dann –20 °C (–30 bis –15 °C)
- 1 Monat bei –20 °C (–30 bis –15 °C)

Unverdünnte Speichelproben bleiben über 3 Einfrier-/Auftauzyklen stabil.

Sollten Ihre Lagerbedingungen von diesen Empfehlungen abweichen, validieren Sie bitte diese spezifischen Lagerbedingungen.

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

Dieses Protokoll beschreibt die Vorbereitung von Proben und Real-time RT-PCR zum Nachweis der SARS-CoV-2-Targets in humanen nasalen, nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedium aufbewahrt werden, und unverdünnten Speichelproben auf dem RGQ MDx 5plex HRM Real-time RT-PCR-Gerät in Verbindung mit der Rotor-Gene Q Software, Version 2.3.1.49 (oder höher).

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 darauf, eine Kontamination mit RNasen während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie nukleasefreie Kunststoffgefäße.

Vorbereitende Schritte

- Atemwegsproben können während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Speichelproben können auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) 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 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 Umschwenken (nicht Vortexen) und eine anschließende kurze Zentrifugation. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3–5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Umschwenken und eine anschließende kurze Zentrifugation homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert für den Nachweisschritt in den klinischen Proben vorhandene RNasen, ist jedoch keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der Real-time RT-PCR-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

Probenvorbereitung: Für Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) befolgen Sie bitte Schritt 1. Für Speichelproben fahren Sie mit Schritt 2 fort.

1. Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche):
 - 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. Speichelproben:
 - 2a. Verflüssigung (zur Erleichterung der Pipettierung): Erhitzen Sie die Speichelproben 15 min lang bei 95 °C (Volumen, Behälter oder Heizvorrichtung nicht näher spezifiziert).

- 2b. Homogenisieren Sie die Probe durch vorsichtiges, 8–10-maliges Auf- und Abpipettieren.
- 2c. Aliquotieren Sie 50 µl der Probe in ein PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
- 2d. Führen Sie einen 15-minütigen Heizschritt bei 95 °C auf einem Heizblock durch. Bewahren Sie die Probe dann mindestens 5 min lang bei Raumtemperatur auf, bevor Sie sie in das PCR-Well oder -Röhrchen laden.
3. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX Reference Dye.
 - 3a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 3c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
4. 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.
 - 4a. Überführen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primers und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 1 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 4b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
 - 4c. 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 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	626,4
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 Kp/µl	10 Kp/µl	1,5	129,6
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	756

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

5. Stellen Sie gemäß Tabelle 2 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich durch 3-maliges Invertieren des Röhrchens.

Tabelle 2. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

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

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumen des SARS-CoV-2 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.

6. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das PCR-Röhrchen für die NEC.
7. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das PCR-Röhrchen für die NTC.
8. Dispensieren Sie 2 µl des SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes PCR-Röhrchen, das dem NEC und den vorbereiteten Proben zugewiesen ist.
9. 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.

10. Geben Sie 15 µl des in Schritt 5 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.

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

12. 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.

13. 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, Yellow und Red

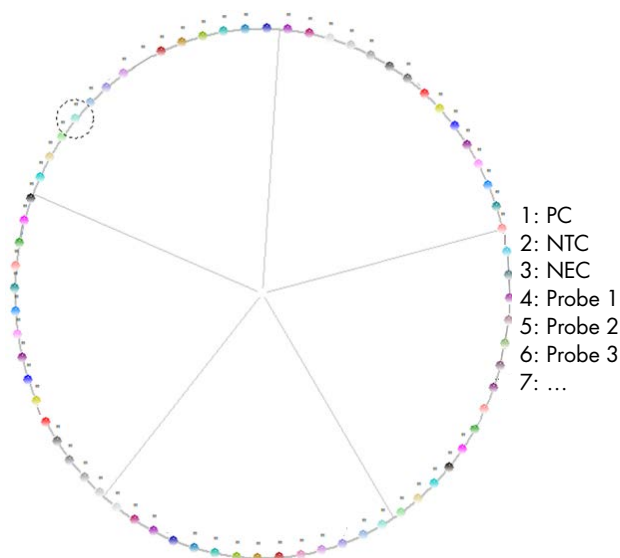


Abbildung 2. Beispiel für eine Röhrenanordnung auf der RGQ MDx 5plex HRM Plattform

14. 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).

15. 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.

16. Wählen Sie „Perform optimization before the first acquisition“ (Optimierung vor der ersten Erfassung durchführen).

17. Starten Sie den Lauf.

18. 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 aufbewahrt werden, und von unverdünnten Speichelproben auf dem ABI 7500 Fast Dx Real-time RT-PCR-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 darauf, eine Kontamination mit RNasen während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie nukleasefreie Kunststoffgefäße.
- Bei Verwendung des ABI 7500 Fast Dx muss dem Röhrchen mit Master-Mix vor der ersten Verwendung ROX-Farbstoff zugegeben werden.

Vorbereitende Schritte

- Atemwegsproben können während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Speichelproben können auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) 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 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 eine anschließende kurze Zentrifugation. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3–5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Umschwenken und eine anschließende kurze Zentrifugation homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert für den Nachweisschritt in den klinischen Proben vorhandene RNasen, ist jedoch keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der Real-time RT-PCR-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

Probenvorbereitung: Für Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) befolgen Sie Schritt 1. Für Speichelproben fahren Sie mit Schritt 2 fort.

1. Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche):
 - 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.

- 1d. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.
2. Speichelproben:
 - 2a. Verflüssigung (zur Erleichterung der Pipettierung): Erhitzen Sie die Speichelproben 15 min lang bei 95 °C (Volumen, Behälter oder Heizvorrichtung nicht näher spezifiziert).
 - 2b. Homogenisieren Sie die Probe durch vorsichtiges, 8–10-maliges Auf- und Abpipettieren.
 - 2c. Aliquotieren Sie 50 µl der Probe in ein PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 2d. Führen Sie einen 15-minütigen Heizschritt bei 95 °C auf einem Heizblock durch. Bewahren Sie die Probe dann mindestens 5 min lang bei Raumtemperatur auf, bevor Sie sie in das PCR-Well oder -Röhrchen laden.
3. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX Reference Dye.
 - 3a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 3c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
4. 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.
 - 4a. Überführen 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.
 - 4b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
 - 4c. Zentrifugieren Sie die Lösung der SARS-CoV-2 Amp Primers mit der IC, damit sie sich am Boden des Röhrchens sammelt.

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 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 Kp/µl	10 Kp/µl	1,5	172,8
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	1008

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

5. Stellen Sie gemäß Tabelle 6 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich durch 3-maliges Invertieren des Röhrchens.

Tabelle 6. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

RT-PCR-Reaktionsgemisch			Anzahl der Reaktionen Volumen (µl)	
Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	1 Rkt.	96 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
Gemisch aus SARS-CoV-2 UM Amp Buffer + ROX	4x	1x	6,25	720
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC	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.

6. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NEC.
7. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NTC.
8. Dispensieren Sie 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes Well für die NEC und in die vorbereiteten Proben.
9. 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.

10. Geben Sie 15 µl des in Schritt 5 vorbereiteten Reaktionsgemischs in die für die Proben und Kontrollen vorgesehenen Wells (siehe Beispiel in Abbildung 3). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
11. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende Well. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
12. 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.
13. Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Wells sammelt.
14. Stellen Sie das Real-time RT-PCR-Programm des ABI 7500 Fast Dx gemäß Tabelle 7 auf den Laufmodus „Standard 7500“ ein.

Hinweis: Vergewissern Sie sich nach dem Klicken auf **file** (Datei) und **new** (Neu), dass der Assay auf **Standard Curve (Absolute Quantitation)** (Standardkurve (Absolute Quantifizierung)) und der Laufmodus auf **Standard 7500** eingestellt ist. Wählen Sie FAM, VIC und Cy5 als Reporterfarbstoffe und stellen Sie Quencher auf **None** (Keine). Die Daten müssen mit **ROX als passive reference** (passive Referenz) erfasst werden.

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

Hinweis: Weitere Informationen finden Sie in der *Gebrauchsanweisung für den ABI 7500 Fast Dx*.

15. Setzen Sie die Platte in den Real-time Thermocycler (ein Beispiel für das Layout einer PCR-Platte ist in Abbildung 3 zu finden) und starten Sie das Zyklusprogramm gemäß der Beschreibung in Tabelle 7.
16. 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.
17. Vergewissern Sie sich, dass die Standardkurve des ABI 7500 Fast Dx auf „Absolute Quantitation“ (Absolute Quantifizierung) eingestellt ist.
18. Starten Sie den Lauf.
19. 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		FAM, VIC und Cy5

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

Abbildung 3. Beispielhafte Plattenanordnung auf dem ABI 7500 Fast Dx

Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem CFX96 Dx

Dieses Protokoll ist für die Vorbereitung und den Nachweis von SARS-CoV-2-Zielen in humanen nasalen, nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedium aufbewahrt werden, sowie in unverdünnten Speichelproben auf dem CFX96 Dx (Bio-Rad Laboratories Inc., Kat.-Nr.1845097-IVD) (optisches Reaktionsmodul) und 1841000-IVD (Thermocycler-Modul) mit der CFX Manager Dx Software, Version 3.1.309001022 oder höher, vorgesehen.

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 darauf, eine Kontamination mit RNasen während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie nukleasefreie Kunststoffgefäße.

Vorbereitende Schritte

- Atemwegsproben können während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Speichelproben können auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) 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 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 Umschwenken (nicht Vortexen) und eine anschließende kurze Zentrifugation. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3–5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Umschwenken und eine anschließende kurze Zentrifugation homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert für den Nachweisschritt in den klinischen Proben vorhandene RNasen, ist jedoch keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der Real-time RT-PCR-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 PCR).
- Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sollte die Vorbereitung der Proben und der Real-time RT-PCR in separaten Bereichen erfolgen.

Verfahren:

Probenvorbereitung: Für Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) befolgen Sie Schritt 1. Für Speichelproben fahren Sie mit Schritt 2 fort.

1. Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche):
 - 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.
 - 1d. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.

2. Speichelproben:
 - 2a. Verflüssigung (zur Erleichterung der Pipettierung): Erhitzen Sie die Speichelproben 15 min lang bei 95 °C (Volumen, Behälter oder Heizvorrichtung nicht näher spezifiziert).
 - 2b. Homogenisieren Sie die Probe durch vorsichtiges, 8–10-maliges Auf- und Abpipettieren.
 - 2c. Aliquotieren Sie 50 µl der Probe in ein PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 2d. Führen Sie einen 15-minütigen Heizschritt bei 95 °C auf einem Heizblock durch. Lassen Sie die Probe dann mindestens 5 min lang bei Raumtemperatur stehen, bevor Sie sie in ein PCR-Well oder -Röhrchen laden.
3. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX Reference Dye.
 - 3a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 3c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
4. Bereiten Sie für eine vollständige CFX96 Dx-Platte (96 Wells) ein Aliquot einer Mischung aus SARS-CoV-2 Amp Primers und SARS-CoV-2 Internal Control vor.
 - 4a. Überführen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primers und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 8 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 4b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
 - 4c. Zentrifugieren Sie die Lösung der SARS-CoV-2 Amp Primers mit der IC, damit sie sich am Boden des Röhrchens sammelt.

Tabelle 8. 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 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 Kp/µl	10 Kp/µl	1,5	172,8
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	1008

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

- Stellen Sie gemäß Tabelle 9 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich durch 3-maliges Invertieren des Röhrchens.

Tabelle 9. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

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

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumen 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.

- Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NEC.
- Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NTC.
- Dispensieren Sie 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes Well für die NEC und in die vorbereiteten Proben.
- 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.

10. Geben Sie 15 µl des in Schritt 5 angesetzten Reaktionsgemischs in die Wells für die Proben und Kontrollen (Abbildung 4 dient als Beispiel). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
11. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende Well. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
12. 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.
13. Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Wells sammelt.
14. Wählen Sie unter **CFX Manager Dx Software > Startup Wizard** (Einrichtungsassistent) für den **run type** (Lauf typ) die Option **user defined** (benutzerdefiniert).
15. Registerkarte **Protocol** (Protokoll): Stellen Sie das RT-PCR-Programm gemäß Tabelle 10 auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl ein.

Hinweis: Klicken Sie im Fenster **Protocol Editor** (Protokolleditor) auf die Schaltfläche **Step Options** (Schrittoptionen) und stellen Sie die „ramp rate“ (Aufheiz-/Abkühlgeschwindigkeit) für jeden der 4 Schritte des RT-PCR-Programms auf 1,6 °C/s ein.

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

Hinweis: Weitere Informationen finden Sie in der *CFX96 Dx Gebrauchsanweisung*.
16. Registerkarte **Plate** (Platte): Wählen Sie die genutzten Wells aus und wenden Sie die Reporterfarbstoffe FAM, HEX und Cy5 an.
17. Setzen Sie die Platte in den Real-time Thermocycler (ein Beispiel für das Layout einer PCR-Platte ist in Abbildung 4 zu finden).
18. Registerkarte **Start Run** (Lauf starten): Klicken Sie auf „Start“ (Starten), um den Lauf zu starten.
19. Analysieren Sie am Ende des Laufs die Ergebnisse (siehe Abschnitt Results).

Tabelle 10. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Programm für den CFX96 Dx

Schritte	Dauer	Temperatur (°C)	Aufheiz- /Abkühlgeschwindigkeit (°C/s)	Anzahl Wiederholungen	Erfassung
1. Reverse Transkription	10 min	50	1,6	1	Nein
2. Anfängliche Hitzeaktivierung der PCR	2 min	95	1,6	1	Nein
2-Schritt-Zyklen				39*	
Denaturierung	5 s	95	1,6	1	Nein
Annealing/Extension	30 s	58	1,6	1	FAM, HEX und Cy5

*Der CFX arbeitet mit Wiederholungen. Damit das Programm 40 Zyklen durchläuft, müssen für die beiden Zyklusschritte 39 Wiederholungen eingestellt werden (als Schritt 5 „GOTO“ in der Software).

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

Abbildung 4. Beispielhafte Plattenanordnung auf dem CFX96 Dx

Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem cobas z 480

Dieses Protokoll beschreibt die Vorbereitung von Proben und Real-time RT-PCR zum Nachweis der SARS-CoV-2-Targets in humanen nasalen, nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedium aufbewahrt werden, und unverdünnten Speichelproben auf dem cobas z 480 mit der LightCycler 480 SW UDF, Version 2.0.0 (oder höher).

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 darauf, eine Kontamination mit RNasen während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie nukleasefreie Kunststoffgefäße.

Vorbereitende Schritte.

- Atemwegsproben können während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Speichelproben können auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) 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 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 Umschwenken (nicht Vortexen) und eine anschließende kurze Zentrifugation. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3–5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Umschwenken und eine anschließende kurze Zentrifugation homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert für den Nachweisschritt in den klinischen Proben vorhandene RNasen, ist jedoch keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der Real-time RT-PCR-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 Real-time RT-PCR).
- Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sollte die Vorbereitung der Proben und der Real-time RT-PCR in separaten Bereichen erfolgen.

Verfahren:

Probenvorbereitung: Für Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) befolgen Sie Schritt 1. Für Speichelproben fahren Sie mit Schritt 2 fort.

1. Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche):
 - 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.
 - 1d. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.

2. Speichelproben:
 - 2a. Verflüssigung (zur Erleichterung der Pipettierung): Erhitzen Sie die Speichelproben 15 min lang bei 95 °C (Volumen, Behälter oder Heizvorrichtung nicht näher spezifiziert).
 - 2b. Homogenisieren Sie die Probe durch vorsichtiges, 8–10-maliges Auf- und Abpipettieren.
 - 2c. Aliquotieren Sie 50 µl der Probe in ein PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 2d. Führen Sie einen 15-minütigen Heizschritt bei 95 °C auf einem Heizblock durch. Bewahren Sie die Probe dann mindestens 5 min lang bei RT auf, bevor Sie sie in das PCR-Well oder -Röhrchen laden.
3. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX Reference Dye.
 - 3a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 3c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
4. Bereiten Sie für eine vollständige cobas z 480-Platte (96 Wells) ein Aliquot einer Mischung aus SARS-CoV-2 Amp Primers und SARS-CoV-2 Internal Control vor.
 - 4a. Überführen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primers und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 11 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 4b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
 - 4c. Zentrifugieren Sie die Lösung der SARS-CoV-2 Amp Primers mit der IC, damit sie sich am Boden des Röhrchens sammelt.

Tabelle 11. 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 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 Kp/µl	10 Kp/µl	1,5	172,8
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	1008

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

5. Stellen Sie gemäß Tabelle 12 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich durch 3-maliges Invertieren des Röhrchens.

Tabelle 12. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

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

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumen 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.

6. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NEC.
7. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NTC.
8. Dispensieren Sie 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes Well für die NEC und in die vorbereiteten Proben.
9. 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.

10. Geben Sie 15 µl des in Schritt 5 angesetzten Reaktionsgemischs in die Wells für die Proben und Kontrollen (Abbildung 5 dient als Beispiel). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
11. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende Well. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
12. 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.
13. Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Wells sammelt.
14. **Erste Verwendung:** Klicken Sie in der LightCycler 480 SW UDF 2.0.0 Software auf **open tools** (Tools öffnen) und wählen Sie **detection formats** (Nachweisformate) aus, um die folgenden Kombinationen aus Anregung und Emission einzustellen: 465–510 (FAM), 540–580 (HEX) und 610–670 (ATTO647N).
15. Stellen Sie das RT-PCR-Programm gemäß Tabelle 13 auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl ein.
Hinweis: Wählen Sie oben auf der Seite **detection format** (Nachweisformat) aus, um das in Schritt 14 erstellte Nachweisformat auszuwählen.
Hinweis: Verwenden Sie in jedem der 5 Schritte des Real-time RT-PCR-Programms eine benutzerdefinierte Aufheiz-/Abkühlgeschwindigkeit von 1,6 °C/s.
Hinweis: Die Datenerfassung sollte während des Annealing-/Elongationsschritts erfolgen.
Hinweis: Weitere Informationen finden Sie in der *Gebrauchsanweisung für den cobas z 480*.
16. Setzen Sie die Platte in den Real-time Thermocycler (ein Beispiel für das Layout einer PCR-Platte ist in Abbildung 5 zu finden).
17. Starten Sie den Lauf.
18. Analysieren Sie am Ende des Laufs die Ergebnisse (siehe Abschnitt Results).

Tabelle 13. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Programm für den cobas z 480

Schritte	Dauer	Temperatur (°C)	Aufheiz- /Abkühlgeschwindigkeit (°C/s)	Anzahl der Zyklen	Analysemodus
Reverse Transkription	10 min	50	1,6	1	Keine
Anfängliche Hitzeaktivierung der PCR	2 min	95	1,6	1	Keine
2-Schritt-Zyklen				40	Quantifizierung
Denaturierung	5 s	95	1,6		Keiner Einzel
Annealing/Extension	30 s	58	1,6		
Abkühlen	1 min	37	1,6	1	Keine

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

Abbildung 5. Beispielhafte Plattenanordnung auf dem cobas z 480

Protokoll: Probenvorbereitung und Nachweis von SARS-CoV-2 auf dem QuantStudio 5 Dx

Dieses Protokoll dient der Vorbereitung und dem Nachweis von SARS-CoV-2-Zielen in menschlichen nasalen, nasopharyngealen oder oropharyngealen Abstrichen, die in Transportmedien aufbewahrt werden, und von unverdünnten Speichelproben auf dem QuantStudio 5 Dx Real-time RT-PCR-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 darauf, eine Kontamination mit RNasen während des Experiments zu vermeiden, und verwenden Sie nukleasefreie Kunststoffgefäße.
- Bei Verwendung des QuantStudio 5 Dx muss dem Röhrchen mit Master-Mix vor der ersten Verwendung ROX-Farbstoff zugegeben werden.

Vorbereitende Schritte

- Atemwegsproben können während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufzubewahren.
- Speichelproben können auf Eis oder bei 4 °C auf einem Kühlgestell aufbewahrt werden; es wird jedoch empfohlen, sie während der Vorbereitungsschritte und der Reaktionseinrichtung bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufzubewahren.
- Bei Verwendung des QuantStudio 5 ist der ROX-Farbstoff erforderlich.

- 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 Umschwenken (nicht Vortexen) und eine anschließende kurze Zentrifugation. Alle anderen Einzelreagenzien können durch Vortexen in Impulsen für 3–5 Sekunden oder durch 2–3-maliges Umschwenken und eine anschließende kurze Zentrifugation homogenisiert werden.
- Der SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inhibiert für den Nachweisschritt in den klinischen Proben vorhandene RNasen, ist jedoch keine Virus-inaktivierende Lösung. Alle Proben sind als potenziell gefährlich zu behandeln.
- Vergewissern Sie sich, dass die Bedingungen für die Reaktionszyklen auf der Real-time RT-PCR-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 Real-time RT-PCR).
- Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, sollte die Vorbereitung der Proben und der Real-time RT-PCR in separaten Bereichen erfolgen.

Verfahren

Probenvorbereitung: Für Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche) befolgen Sie Schritt 1. Für Speichelproben fahren Sie mit Schritt 2 fort.

1. Atemwegsproben (nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstriche):
 - 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.
 - 1d. Lassen Sie die Proben mindestens 5 min lang auf Eis abkühlen. Bewahren Sie die Proben anschließend auf Eis oder bei 4 °C auf.

2. Speichelproben:
 - 2a. Verflüssigung (zur Erleichterung der Pipettierung): Erhitzen Sie die Speichelproben 15 min lang bei 95 °C (Volumen, Behälter oder Heizvorrichtung nicht näher spezifiziert).
 - 2b. Homogenisieren Sie die Probe durch vorsichtiges, 8–10-maliges Auf- und Abpipettieren.
 - 2c. Aliquotieren Sie 50 µl der Probe in ein PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 2d. Führen Sie einen 15-minütigen Heizschritt bei 95 °C auf einem Heizblock durch. Bewahren Sie die Probe dann mindestens 5 min lang bei RT auf, bevor Sie sie in das PCR-Well oder -Röhrchen laden.
3. Vervollständigen Sie beim ersten Gebrauch den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit dem ROX Reference Dye.
 - 3a. Geben Sie 32,8 µl des ROX-Farbstoffs in ein Röhrchen mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 3b. Schließen Sie den Deckel des Röhrchens mit SARS-CoV-2 UM Amp Buffer und ROX-Farbstoff und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um.
 - 3c. Zentrifugieren Sie den SARS-CoV-2 UM Amp Buffer mit ROX-Farbstoff, sodass er sich am Boden des Röhrchens sammelt.
4. Bereiten Sie für eine vollständige QuantStudio 5 Dx-Platte (96 Wells) ein Aliquot einer Mischung aus SARS-CoV-2 Amp Primers und SARS-CoV-2 Internal Control vor.
 - 4a. Überführen Sie die erforderlichen Volumen der SARS-CoV-2 Amp Primers und der SARS-CoV-2 Internal Control gemäß Tabelle 14 in ein neues PCR-freies 1,5-ml-Röhrchen.
 - 4b. Schließen Sie den Deckel und schwenken Sie das Röhrchen 3-mal um oder vortexen Sie es 3–5 s lang in Impulsen.
 - 4c. Zentrifugieren Sie die Lösung der SARS-CoV-2 Amp Primers mit der IC, damit sie sich am Boden des Röhrchens sammelt.

Tabelle 14. 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 Rkt. (+ 20 % zusätzliches Volumen*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3,45x	1x	7,25	835,2
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 Kp/µl	10 Kp/µl	1,5	172,8
Gemisch aus SARS-CoV-2 Amp Primers + IC insgesamt			8,75	1008

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

5. Stellen Sie gemäß Tabelle 15 ein Reaktionsgemisch her und mischen Sie es gründlich durch 3-maliges Invertieren des Röhrchens.

Tabelle 15. Zusammensetzung des Reaktionsgemischs

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

* **Hinweis:** Passen Sie die Volumen 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.

6. Dispensieren Sie 8 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NEC.
7. Laden Sie 10 µl nukleasefreies Wasser in das Well für die NTC.
8. Dispensieren Sie 2 µl SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in jedes Well für die NEC und in die vorbereiteten Proben.
9. 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.

10. Geben Sie 15 µl des in Schritt 5 angesetzten Reaktionsgemischs in die Wells für die Proben und Kontrollen (Abbildung 6 dient als Beispiel). Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
11. Laden Sie 10 µl der SARS-CoV-2 Positive Control in das entsprechende Well. Mischen Sie durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren.
12. 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.
13. Zentrifugieren Sie die PCR-Platte kurz, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Wells sammelt.
14. **Erste Verwendung:** Die Vorlage muss in der QuantStudio 5 Dx TD-Software, Version 1.0.1 oder höher, generiert und veröffentlicht werden, bevor der Lauf in der QuantStudio 5 Dx IVD-Software gestartet werden kann. Richten Sie die Vorlage entsprechend ein:
Hinweis: Stellen Sie in der Registerkarte **Properties** (Eigenschaften) den **Experiment type** (Experimenttyp) auf **Standard Curve** (Standardkurve) und den **Run mode** (Laufmodus) auf **Standard** ein.
Hinweis: Stellen Sie in der Registerkarte **Method** (Methode) das Real-time RT-PCR-Programm auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl ein (Tabelle 16).
Hinweis: Die Datenerfassung sollte während des Annealing-/Elongationsschritts erfolgen.
Hinweis: Wählen Sie in der Registerkarte **Plate** (Platte) als **Passive Reference** (Passive Referenz) **ROX** aus und stellen Sie als Ziele FAM, VIC und Cy5 ohne Quencher (Auswahl von **None** (Keine)) ein.
Hinweis: Weitere Informationen finden Sie in der *QuantStudio 5 Dx Gebrauchsanweisung*.
15. Laden Sie in der QuantStudio 5 Dx IVD-Software die zuvor in Schritt 14 erstellte Vorlage. Wählen Sie die genutzten Wells aus und wenden Sie die Ziele FAM, VIC und Cy5 an.
16. Setzen Sie die Platte in den Real-time Thermocycler (ein Beispiel für das Layout einer PCR-Platte ist in Abbildung 6 zu finden).
17. Starten Sie den Lauf.
18. Analysieren Sie am Ende des Laufs die Ergebnisse (siehe Abschnitt Results).

Tabelle 16. SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Programm für den QuantStudio 5 Dx

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

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

Abbildung 6. Beispielhafte Plattenanordnung auf dem QuantStudio 5 Dx

Ergebnisse

Analyse auf dem RGQ MDx 5plex HRM

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).

Für die Datenanalyse müssen bestimmte Zyklen gelöscht werden (Abbildung 7): Öffnen Sie den Rohkanal **Cycling A.Green**. Navigieren Sie zu Options (Optionen) > **Crop Start Cycles** (Erste Zyklen löschen) und geben Sie in das Dialogfeld **5** ein. Es wird ein neuer Kanal mit dem Namen Cycling A(from 5).Green erstellt. Dasselbe muss für die Rohkanäle Red und Yellow durchgeführt werden, um die Kanäle **Cycling A(from 5).Red** und **Cycling A(from 5).Yellow** zu erstellen.

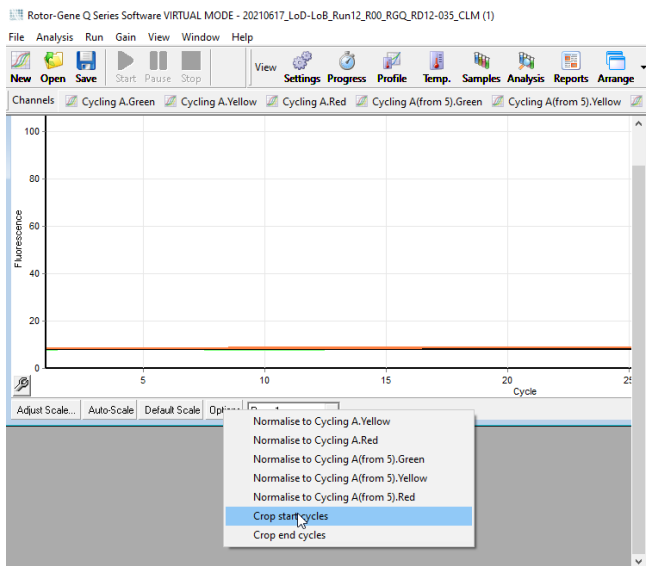


Abbildung 7. Screenshot der Festlegung gelöschter Zyklen für die Laufanalyse auf dem RGQ MDx 5plex HRM

Öffnen Sie das Analysemenü (Abbildung 8) und wenden Sie auf jeden erstellten Kanal „Cycling A(from 5)“ die folgenden Analyseparameter an, sodass die Konsistenz zwischen verschiedenen Analysen gewahrt bleibt (Tabelle 17).

Tabelle 17. 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: Reaktionseffizienzschwellenwert	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 können im Format „durch Komma getrennte Werte“ (.csv) gespeichert werden: Wählen Sie im Fenster der RGQ Software **File (Datei) > save as (Speichern unter) > Excel analysis sheet (Excel-Analyseblatt)**. Vergewissern Sie sich vor dem Export der Ergebnisse, dass alle Proben ausgewählt sind (Abbildung 8).

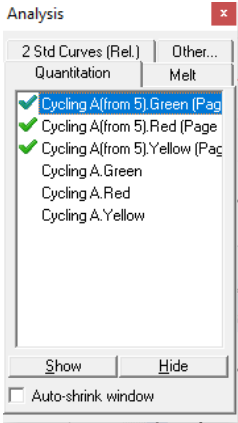


Abbildung 8. Screenshot der für die Anwendung der Analyseparameter und den Ergebnisexport ausgewählten Kanäle (Laufanalyse mit dem RGQ MDx 5plex HRM).

Analyse auf dem ABI 7500 Fast Dx

Auf dem ABI 7500 Fast Dx werden die Daten mit der 7500 Fast System Software, Version 1.4.1 (oder höher), gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Wählen Sie in der Registerkarte **setup** (Einrichtung) eine Gruppe von Wells oder die gesamte für die Analyse verfügbare Platte aus und rechtsklicken Sie, um die Well-Inspektor-Fenster zu öffnen. Die 3 Fluorophore (FAM, VIC und Cy5) müssen ausgewählt werden, und als **Passive reference** (Passive Referenz) ist **ROX** auszuwählen. Die folgenden Parameter sind erforderlich, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Analysen zu gewährleisten (Tabelle 18).

Tabelle 18. Analyseparameter für den ABI 7500 Fast Dx

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

In der ABI SDS Software sind die Ct-Werte einer ausgewählten Gruppe von Wells oder der gesamten Platte im Blatt **Data** (Daten) des Hauptbereichs **Results** (Ergebnisse) verfügbar. Die Daten können im Format „durch Komma getrennte Werte“ (.csv) gespeichert werden: 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“.

Analyse auf dem CFX96 Dx

Auf dem CFX96 Dx werden die Daten mit der CFX Manager Dx Software, Version 3.1.3090.1022 (oder höher), gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. FAM, HEX und Cy5 müssen für alle im Experiment genutzten Wells ausgewählt werden. Die folgenden Parameter sind erforderlich, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Analysen zu gewährleisten (Tabelle 19).

Tabelle 19. Analyseparameter für den CFX96 Dx

Kanäle	FAM	HEX	Cy5
Cq-Bestimmungsmodus:	Ja	Ja	Ja
Einzeller Schwellenwert			
Basislinieneinstellung:			
• Subtrahierte Kurvenanpassung	Ja	Ja	Ja
• Anwendung von Fluoreszenzdrift-Korrektur	Ja	Ja	Ja
Schwellenwert (RFU)	250	300	100
Cut-off-Zyklen	Ct > 39,00 wird als 40,00 betrachtet	Ct > 35,00 wird als 40,00 betrachtet	Nein

In der CFX Manager Dx Software sind die Ct-Werte (in der Software als **Cq** bezeichnet) einer ausgewählten Gruppe von Wells oder der gesamten Platte im Datenblatt des Bereichs **Quantification Data** (Quantifizierungsdaten) verfügbar. Durch Auswahl von **Export** (Exportieren) > **Custom Export** (Benutzerdefinierter Export) und Einstellen der Parameter gemäß Abbildung 9 können die Daten im Format „durch Komma getrennte Werte“ (**.csv**) exportiert werden.

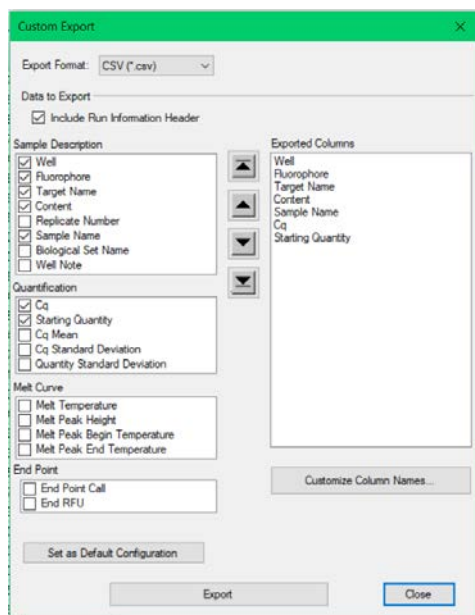


Abbildung 9. Rohdatendatei-Parameter für den CFX96 Dx

Analyse auf dem cobas z 480

Auf dem cobas z 480 werden die Daten mit der LightCycler 480 SW UDF, Version 2.0.0 (oder höher), gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Erstellen Sie eine Untergruppe von Proben ausschließlich mit den in diesem Experiment genutzten Wells. Erstellen Sie für jeden Kanal eine Analyseseite **Abs Quant/Fit Points** (Absolute Quantifizierung/Punkte anpassen) und verwenden Sie die folgenden Parameter, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Experimenten zu gewährleisten (Tabelle 20).

Tabelle 20. Analyseparameter für den cobas z 480

Kanäle	FAM (465–510)	HEX (540–580)	ATTO647N (610–670)
Registerkarte „Cycle range“ (Zyklusbereich)	1–40	1–40	6–40
• Erster – letzter Zyklus			
• Hintergrund	5/10	5/10	6/11
Registerkarte „Noise band“ (Rauschband)	STD Multiplier	STD Multiplier	STD Multiplier
• Methode			
• STD Multiplier-Wert	50	40	25
Registerkarte „Analysis“ (Analyse)	2	2	2
• Punkte anpassen			
• Schwellenwertmethode	Auto	Auto	Auto
Cut-off-Zyklus	Ct > 39,00 wird als 40,00 betrachtet	Ct > 35,00 wird als 40,00 betrachtet	Nein

In der LightCycler 480 SW UDF, Version 2.0.0 (oder höher), sind die Ct-Werte (in der Software als **Cp** bezeichnet) einer ausgewählten Gruppe von Wells oder der gesamten Platte im Bereich **analysis** (Analyse) verfügbar (Abbildung 10). Die Daten können durch Rechtsklick auf die Ergebnistabelle und Auswahl von **Export table** (Tabelle exportieren) nach Kanal als Textdatei (**.txt**) exportiert werden.

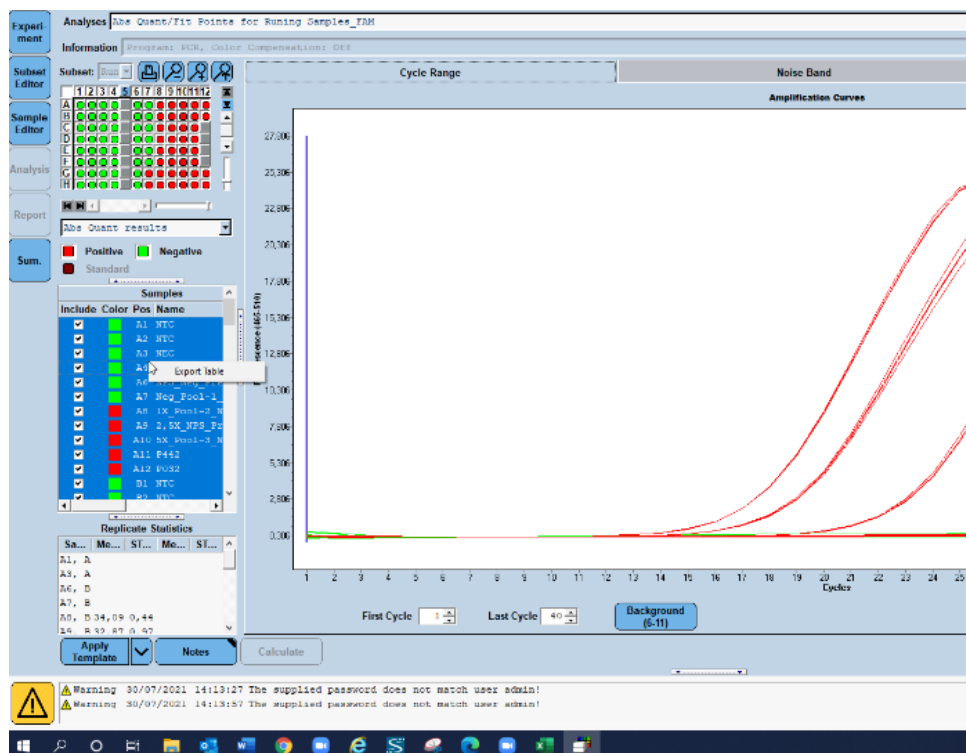


Abbildung 10. Screenshot der exportierten Daten in der LightCycler 480 SW UDF, Version 2.0.0 (oder höher).

Analyse auf dem QuantStudio 5 Dx

Auf dem QuantStudio 5 Dx werden die Daten mit der QuantStudio 5 Dx IVD Software, Version 1.0.1 (oder höher), gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Im Fenster **Assign Targets and Samples** (Ziele und Proben zuweisen) müssen die 3 Fluorophore (FAM, VIC und Cy5) für alle im Experiment genutzten Wells ausgewählt werden, und als **Passive reference** (Passive Referenz) ist **ROX** auszuwählen. Die folgenden Parameter sind erforderlich, um eine Konsistenz zwischen den verschiedenen Analysen zu gewährleisten (Tabelle 21).

Tabelle 21. Analyseparameter für den QuantStudio 5 Dx

Kanäle	FAM	VIC	Cy5
Passivfarbstoff	ROX	ROX	ROX
Fluoreszenzschwelle	0,21	0,062	0,04
Basislinieneinstellung	Auto	Auto	Auto
Cut-off-Zyklen	Ct > 39,00 wird als 40,00 betrachtet	Ct > 35,00 wird als 40,00 betrachtet	Nein

Die Daten können als Tabelle oder als Text (.xls, .xlsx, .txt) formatiert werden. Wählen Sie in der Registerkarte **Export** (Exportieren) der QuantStudio 5 Dx IVD Software alle Optionen im Bereich **content** (Inhalt) an und wählen Sie die Option **unify the above content into one file** (obige Inhalt in einer Datei zusammenführen).

Interpretation der Ergebnisse

Die Positivkontrolle (Positive Control, PC) sowie das N1- und das N2-Gen werden auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Green“ und auf dem ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx im Fluoreszenzkanal „FAM“ nachgewiesen.

Die Probenkontrolle, bestehend aus RNase P, wird auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Yellow“ und auf dem ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx im Fluoreszenzkanal „VIC/HEX“ nachgewiesen. Für jede klinische Probe sollte eine Amplifikation der Probenkontrolle erfolgen. Bei der PC kann trotz des Fehlens humaner Sequenzen eine Amplifikation im Kanal „Yellow“ beobachtet werden. In diesem Fall kann ein Signal für die PC im Kanal „Yellow“ ignoriert werden, da das starke Fluoreszenzsignal aus dem Kanal „Green“ in den Kanal „Yellow“ übergehen kann. Die interne Kontrolle (Internal Control, IC) ist in den SARS-CoV-2 Amp Primers enthalten. Der Nachweis der Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC), der Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC), der Positivkontrolle (Positive Control, PC) und der klinischen Proben erfolgt auf dem RGQ MDx 5plex HRM im Fluoreszenzkanal „Red“ und auf dem ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx im Fluoreszenzkanal „Cy5/ATTO647N“. Damit ein Real-time RT PCR-Lauf als gültig betrachtet wird, müssen die Kontrollen PC, NTC und NEC die aufgeführten Ergebnisse liefern (siehe Tabelle 22, Tabelle 23).

Tabelle 22. Laufvalidierungskriterien und Ergebnisinterpretation für den RGQ MDx 5plex HRM

Kontrolle	Detektion im Kanal „Green“	Detektion im Kanal „Yellow“	Detektion im Kanal „Red“	Interpretation
Positivkontrolle (Positive Control, PC)	Ct ≤ 38,00	Indifferent	Indifferent	PC ist gültig.
	Ct > 38,00 oder Kein Ct	Indifferent	Indifferent	PC ist ungültig.
Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) oder Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC)	Ct > 38,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	NTC/NEC ist gültig.
	Beliebige andere Kombinationen mit Amplifikation im Kanal „Green“ oder „Yellow“		Indifferent	NTC/NEC ist ungültig.

Tabelle 23. Kriterien für die Laufgültigkeit und Ergebnisinterpretation für ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx Real-time RT-PCR-Geräte

Kontrolle	Detektion im FAM-Farbstoff*	Detektion im VIC/HEX-Farbstoff*	Detektion im Cy5/ATTO647N-Farbstoff*	Interpretation
Positivkontrolle (Positive Control, PC)	Ct ≤ 39,00	Indifferent	Indifferent	PC ist gültig.
	Ct > 39,00 oder Kein Ct	Indifferent	Indifferent	PC ist ungültig.
Kontrolle ohne Template (No Template Control, NTC) oder Extraktionskontrolle (No Extraction Control, NEC)	Ct > 39,00 oder Kein Ct	Ct > 35,00 oder Kein Ct	Ja	NTC/NEC ist gültig.
	Alle anderen Kombinationen mit Amplifikation in FAM oder VIC/HEX		Indifferent	NTC/NEC ist ungültig.

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

Tabelle 24. 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. Die Real-time RT-PCR ist inhibiert. Wiederholungstest erforderlich.

Tabelle 25. Kriterien für die Probengültigkeit und Ergebnisinterpretation für ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx Real-time RT-PCR-Geräte.

Detektion im FAM-Farbstoff*	Detektion im VIC/HEX-Farbstoff*	Detektion im Cy5/ATTO647N-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. Die Real-time RT-PCR ist inhibiert. Wiederholungstest erforderlich.

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 Real-time RT-PCR-Plattform (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, cobas z 480, or QuantStudio 5 Dx) erforderlich.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht benutzt werden.
- Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden nicht für Speichelproben von Patienten ohne Anzeichen und Symptome einer Atemwegsinfektion bestimmt.
- Um das Risiko falsch negativer Ergebnisse beim Testen schwach positiver klinischer Proben zu vermeiden, wenn sichtbare Blutspuren im Röhrchen erkennbar sind, sollte dies dokumentiert werden. Falls dann bei Verwendung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ein negatives Ergebnis erhalten wird, sollte eine neue Probe entnommen und abermals mit dem *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit getestet werden.

Leistung

Analytische Sensitivität (Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität oder Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist definiert als die niedrigste Konzentration, bei der ≥ 95 % der getesteten Proben ein positives Ergebnis liefern. Die LoD wurde durch die Analyse serieller Verdünnungen negativer nasopharyngealer Abstrichproben und verflüssigter unverdünnter Speichelproben bestimmt, die mit hochkonzentrierten Stämmen inaktivierter Viruspartikel von kommerziellen Anbietern (ZeptoMetrix®) hergestellt wurden. Für die LoD-Experimente wurden je Probe zwei Probenpools verwendet. Um die ermittelte LoD-Konzentration zu bestätigen, muss die Detektionsrate aller Wiederholungen ≥ 95 % sein (mindestens 19/20 Wiederholungen müssen ein positives Signal erzeugen).

Die LoD-Konzentration wurde anhand nasopharyngealer Proben und unverdünnter Speichelproben auf den angegebenen Real-time RT-PCR-Plattformen (RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx, QuantStudio 5 Dx und cobas z 480) bestätigt.

Nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Proben

Die LoD wird mit 950 Kp/ml für RGQ MDx, ABI 7500 Fast Dx, CFX96 Dx und QuantStudio 5 Dx sowie mit 475 Kp/ml für cobas z 480 angegeben (siehe Tabelle 26).

Unverdünnte Speichelproben

Die LoD wird mit 950 Kp/ml für den RGQ MDx und 1200 Kp/ml für ABI 7500 Fast Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx und CFX96 Dx angegeben (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26. Übersicht über die LoD-Ergebnisse für die einzelnen Real-time RT-PCR-Plattformen

Plattform	Probentyp	Bestätigte LoD (Kp/ml)
RGQ MDx	NPS	950
	Unverdünnter Speichel	950
ABI 7500 Fast Dx	NPS	950
	Unverdünnter Speichel	1200
QuantStudio5 Dx	NPS	950
	Unverdünnter Speichel	1200
cobas z 480	NPS	475
	Unverdünnter Speichel	1200
CFX96 Dx	NPS	950
	Unverdünnter Speichel	1200

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 abgeglichen (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 (Tabelle 27) mittels In-silico-PCR mit einer maximal möglichen Amplifikatgröße von 500 bp analysiert. Die Pathogen-Sequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank, jedoch zeigte keiner dieser Pathogene eine Amplifikation *in silico*. Tabelle 27 enthält die Liste der *in silico* getesteten Pathogene.

Tabelle 27. Liste der *in silico* getesteten Pathogene.

Pathogene	Stamm/Typ	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> -PCR-Ergebnisse
Adenovirus Typ 3	Typ 3	45659	Keine Übereinstimmung
Adenovirus Typ 4	Typ 4	28280	Keine Übereinstimmung
Adenovirus Typ 5	Typ 5	28285	Keine Übereinstimmung
Adenovirus Typ 7A	Typ 7A	85755	Keine Übereinstimmung
Adenovirus Typ 14	Typ 14	10521	Keine Übereinstimmung
Adenovirus Typ 31	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>	CWL-029 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 27. (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Pathogene	Stamm/Typ	Taxonomie-ID	<i>In-silico</i> -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 Primers aufwiesen. Die Proben wurden vorbereitet, indem die Matrix der nasopharyngealen Abstriche mit potenziell kreuzreaktiven Organismen bei 10^6 Kp/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 mikrobielle Interferenz des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit Assays wurde *in vitro* anhand eines Panels empfohlener Pathogene (Tabelle 28) 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 Kp/ml für bakterielle und fungale Ziele, oder bei der höchstmöglichen Konzentration auf Basis der Stammkonzentration. Die NATtrol™ 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 28 enthält die Liste der auf mikrobielle Interferenz getesteten Pathogene.

Tabelle 28. 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	Kp/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	Kp/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	
Pool 3	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2.86E+04	TCID50/ml	Keine Interferenz
	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.72E+03	Kp/ml	
	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	

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 28 (Fortsetzung von der vorhergehenden Seite)

Pool-ID/Proben-ID	Mikroorganismus	Quelle	Endkonzentration	Einheit	Ergebnis
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2.73E+03	Kp/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	Kp/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	Kp/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 28 (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	Kp/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	Kp/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	Kp/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	Kp/ml	Keine Interferenz
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Unbekannt*	k. A.	

* Konzentration wird vom Lieferanten nicht mitgeteilt.

Störsubstanzen

Nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Abstrichproben

Die Auswirkung von mutmaßlichen Störsubstanzen (die in Tabelle 29 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 in den Fluoreszenzkanälen „Green“ und „Red“ wurden zwischen dem Test und den entsprechenden Kontrollproben verglichen. Bei Abwesenheit von Störungen haben der Test und die zugehörigen Kontrollproben die gleiche Trefferquote.

Tabelle 29 zeigt, dass keine der getesteten Substanzen die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Fluoreszenzkanal „Green“ beeinträchtigt.

Tabelle 29. Liste der Störsubstanzen und Trefferquoten im Kanal „Green“.

Störsubstanzen	Funktion	Getestete Konzentration	Trefferquotenergebnisse bei negativem nasopharyngealem Abstrich	Trefferquotenergebnisse bei positivem nasopharyngealem Abstrich (4x LoD)
Tobramycin	Systemisches Antibiotikum	1 mg/ml	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Mupirocin	Antibiotika-Nasensalbe	6,6 mg/ml	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Fluticason	Nasales Kortikosteroid	5 % (v/v)	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Menthol (Halstabletten)	Orales Anästhetikum und Analgetikum	0,5 mg/ml	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Oxymetazolin	Nasenspray	10% (v/v)	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Oseltamivir	Antivirales Medikament	3,3 mg/ml	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Mucin (Rinder-Submaxillardrüse Typ I-S)		2,5 mg/ml	Keine Interferenz 0/15	Keine Interferenz 15/15
Vollblut		4% (v/v)	Keine Interferenz 1/15*	Keine Interferenz 15/15

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

Unverdünnte Speichelproben

Die Auswirkung von acht mutmaßlichen Störsubstanzen (die in Tabelle 30 aufgeführten Substanzen) auf die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit wurde bewertet. Die Tests wurden an 1 Pool negativer unverdünnter Speichelproben durchgeführt, der zweigeteilt wurde, um mit zwei verschiedenen Verdünnungsstufen zu arbeiten: (1) negative unverdünnte Speichelproben und (2) künstlich positive unverdünnte Speichelproben (gewonnen durch Versetzen des negativen Pools mit inaktivierten SARS-CoV-2-Viruspartikeln (Zeptomatrix) bei 3x LoD (3600 Kp/ml)). Die unverdünnten Speichelproben wurden unter Verwendung eines handelsüblichen Kits mit der cobas z 480 Plattform durch 3 Bediener getestet.

Für jede Störsubstanz wurden die Probenreplikate zweigeteilt, um entweder die in einem Lösungsmittel gelöste Störsubstanz (Testprobe) oder das Lösungsmittel allein (Kontrollprobe) zu testen. Die Trefferquoten in den Fluoreszenzkanälen „Green“, „Red“ und „Yellow“ wurden zwischen dem Test und den entsprechenden Kontrollproben verglichen. Liegen keine Interferenzen vor, haben der Test und die zugehörigen Kontrollproben die gleiche Trefferquote.

Bezogen auf die qualitative Analyse (Probenstatus) haben die acht getesteten Störsubstanzen (siehe Tabelle 30) keine Auswirkungen auf die Ergebnisse des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit für positive und negative Speichelproben.

Tabelle 30 zeigt, dass keine der getesteten Substanzen die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Fluoreszenzkanal „Green“ beeinträchtigt.

Tabelle 30. Liste der Störsubstanzen und Trefferquoten im Kanal „Green“.

Störsubstanz*	Funktion	Getestete Konzentration	Trefferquotenergebnisse in negativen unverdünnten Speichelproben	Trefferquotenergebnisse in positiven unverdünnten Speichelproben (3 bis 5x LoD)
Vollblut	Endogene Substanz: Humane gDNA, Leukozyten, Erythrozyten	1 % v/v	Keine Interferenz* 0/8	Keine Interferenz* 8/8
Altoids®	Bonbon	2 % w/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Aspirin	Entzündungshemmes Medikament	1 % w/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Listerine®	Antiseptische Mundspülung	1 % v/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Ricola®	Bonbon	1 % w/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Colgate® Total SF Whitening™ Zahnpasta	Weißende Zahnpasta	0,1 % w/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Tussidane® Sirop	Medikament für trockenen Husten	1 % v/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8
Pulmofluide®	Medikament für feuchten Husten	1 % v/v	Keine Interferenz 0/8	Keine Interferenz 8/8

*Für das Vollblut wurde ein Störeffekt beim Nachweis der IC im Kanal „Red“ beobachtet (Hemmung von 10–40 %), der jedoch keine Auswirkungen auf die Probengültigkeit hat. Im Kanal „Green“ wurde der Probenstatus nicht durch Vollblut beeinträchtigt, aber es ließ sich eine leichte Ct-Drift beobachten (durchschnittlich 1,35 Ct später mit Vollblut verglichen mit der Kontrollprobe).

Um das Risiko falsch negativer Ergebnisse beim Testen schwach positiver klinischer Proben zu vermeiden, wenn sichtbare Blutspuren im Röhrchen erkennbar sind, sollte dies dokumentiert werden. Falls dann bei Verwendung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ein negatives Ergebnis erhalten wird, sollte dem Patienten erneut unverdünnter Speichel entnommen und abermals mit dem *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit getestet werden.

Probenstabilitätsstudie

Die Probenstabilitätsstudie wurde durchgeführt, um die Auswirkungen verschiedener Probenlagerungsbedingungen auf die qualitativen (Trefferquotenanalyse) und quantitativen (Ct-Drift-Analyse) Ergebnisse der *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kits zu untersuchen. Die Experimente umfassten die Analyse zweier Verdünnungsstufen: (1) negative Proben und (2) künstlich positive Proben, die durch Versetzen mit inaktivierten SARS-CoV-2-Viruspartikeln (Zeptomatrix) gewonnen wurden. Um die Stabilität der Proben (Speichel und NPS) zu bestätigen, war es erforderlich, dass ≥ 95 % der Replikate die gleiche Trefferquote ergeben und für jede Stabilitätsbedingung eine Ct-Drift ≤ 10 % gegenüber dem Zeitpunkt 0 eintritt.

Nasale, oropharyngeale und nasopharyngeale Proben:

Die verschiedenen getesteten Stabilitätsbedingungen sind in Tabelle 31 aufgeführt. Es wurden Tests anhand von 3 Probenpools durchgeführt. Negative NPS-Proben, künstlich positive NPS-Proben bei 5x LoD (4750 Kp/ml) und drei Chargen Chargenfreigabe-Proben BRS1 (N2 string, 1000 Kp/10 µl), BRS2 (RNAse P gblock, 1000 Kp/10 µl) und BRS3 (N1 string, 1000 Kp/10 µl) wurden auf der ABI 7500 Fast Dx Plattform getestet.

Aus den qualitativen und quantitativen Analyseergebnissen lässt sich folgern, dass die getesteten Lagerungsbedingungen für NPS-Proben keinen Einfluss auf die Trefferquote hatten (es wurde der erwartete Probenstatus nachgewiesen) und nicht zu signifikanten Ct-Drifts der Ergebnisse des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit führten. Damit war die Leistung des Kits bei allen getesteten Lagerungsbedingungen der NPS-Proben stabil (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31 zeigt die Stabilitätsbedingungen für nasopharyngeale Proben

Tabelle 31. Stabilitätsbedingungen für nasopharyngeale Proben.

Bedingungen	Angegebene Probenstabilität
F/T	3 F/T
4 °C (2 °C–8 °C)	72 h
–70 °C	2 Wochen

Unverdünnte Speichelproben

Die verschiedenen getesteten Stabilitätsbedingungen sind in Tabelle 32 aufgeführt. Es wurden Tests anhand von 2 Probenpools durchgeführt. Negative unverdünnte Speichelproben und künstlich positive unverdünnte Speichelproben bei 3xLoD (3600 Kp/ml) wurden auf der ABI 7500 Fast Dx Plattform getestet.

Aus den qualitativen und quantitativen Analyseergebnissen lässt sich folgern, dass die getesteten Lagerungsbedingungen keinen Einfluss auf die Trefferquote hatten (es wurde der erwartete Probenstatus nachgewiesen) und nicht zu signifikanten Ct-Drifts der Ergebnisse des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit führten. Damit war die Leistung des Kits bei allen getesteten Lagerungsbedingungen der unverdünnten Speichelproben stabil.

Tabelle 32 zeigt die Stabilitätsbedingungen für unverdünnte Speichelproben.

Tabelle 32. Stabilitätsbedingungen für unverdünnte Speichelproben

Bedingungen	Angegebene Probenstabilität
F/T	3 F/T
RT (18 °C–26 °C)	72 h
4 °C (2 °C–8 °C)	72 h
Kombinierte Bedingungen: 6 Stunden bei RT, kombiniert mit 72 h bei 4 °C (2–8 °C), kombiniert mit 8 Tagen bei –20 °C (–30 °C bis –15 °C)	6 h RT, dann 72 h bei 4 °C (2–8 °C), dann 7 Tage - 20 °C (–30 °C bis –15 °C)
–20 °C (–30 °C bis –15 °C)	1 Monat (30,5 Tage)

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 in den Kanälen „Green“, „Yellow“ und „Red“ zu bestimmen. Tabelle 33 zeigt, dass das *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit eine Gesamtpräzision von 0,63 SD (2,03 %CV) im Kanal „Green“, 0,54 SD (2,22 %CV) im Kanal „Yellow“ und 1,28 SD (4,10 %CV) im Kanal „Red“ aufweist.

Tabelle 33. 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 (SD) (Variationskoeffizient (%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)

Proben und Detektionskanal	Insgesamt	Tag-zu- Tag	Charge- zu-Charge	Bediener-zu- Bediener	Instrument-zu- Instrument	Lauf- zu-Lauf	Innerhalb des Laufs
Standardabweichung (SD) (Variationskoeffizient (%CV))							
Gespikte 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)
Gespikte 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

Nasopharyngeale Abstriche

Die klinischen Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp Assays wurden anhand von 150 retrospektiven klinischen nasopharyngealen Abstrichproben in Transportmedium bewertet.

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 34 zeigt die Leistung des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode.

Tabelle 34. Klinische Leistungsmerkmale des *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* im Vergleich zu einer Referenzmethode.

Probenstatus	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativ	98	5,1 (5/98)	-	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 Percentage Agreement, PPA) und prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) ausgedrückt und sind in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35. Klinische Leistungsmerkmale des *artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit* nach Analyse der abweichenden Ergebnisse.

Probenstatus	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	1,9 (1/52)	-
Negativ	98	5,1 (5/98)	-	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 %)

Nasopharyngeale Abstriche einschließlich solcher von asymptomatischen Personen

Die klinischen Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp Assays wurden anhand von 153 retrospektiven klinischen nasopharyngealen Abstrichproben in Transportmedium bewertet.

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 23).

Tabelle 36 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 36. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode

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

Neunzehn abweichende Ergebnisse wurden mit einer dritten Methode untersucht und anhand einer Kontingenztafel neu analysiert. Die Gesamtergebnisse für die klinischen Leistungsmerkmale werden als prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percentage Agreement, PPA) und prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) ausgedrückt und sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nach Analyse der abweichenden Ergebnisse.

Probenstatus	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0 (0/32)	-
Negativ	105	0,95 (1/105)	-	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 %)

Unverdünnte Speichelproben

Die klinischen Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp Assays wurden anhand von 142 unverdünnten Speichelproben bewertet.

Alle Proben wurden von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer COVID-19-Infektion entnommen. Die klinische Validierung wurde mit dem ABI 7500 Fast Dx durchgeführt. Zwölf Proben wurden nach dem Test mit dem *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit von der Analyse ausgeschlossen, ebenso wie die Referenzmethode, da beide Tests gemäß den Probenvaliditätskriterien als ungültig eingestuft wurden.

Tabelle 38 zeigt die Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode.

Tabelle 38. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit im Vergleich zu einer Referenzmethode.

Probenstatus	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	45	93,33 (42/45)	82,14–97,71	6,67 (3/45)	–
Negativ	85	0 (0/85)	–	100 (85/85)	95,68–100,00

Drei abweichende Ergebnisse wurden mit einer dritten Methode untersucht 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 39 dargestellt.

Tabelle 39. Klinische Leistungsmerkmale des *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nach Analyse der abweichenden Ergebnisse.

Probentyp	N	% Positiv	95%-KI	% Negativ	95%-KI
Positiv	43	97,67 (42/43)	87,94–99,59	2,32 (1/43)	–
Negativ	87	0 (0/87)	–	100 (87/87)	95,68–100,00

Zwei falsch negative Ergebnisse wurden nach der erneuten Analyse als richtig negativ eingestuft, während bei einem Ergebnis die Einstufung als falsch negativ beibehalten wurde.

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): 42/43 = **97,67 %** (95%-KI: 87,94 %–99,59 %)

Prozentuale negative Übereinstimmung

(Negative Percent Agreement, NPA): 87/87 = **100,00 %** (95%-KI: 95,68 %–100,00 %)

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 (Green) für die analytischen SARS-CoV-2-RT-PCR-Ziele, den Fluoreszenzkanal HEX/VIC/JOE (Yellow) für die Probenkontrolle und Cy5/Atto (Red) 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 Real-time RT-PCR-Plattform während der Datenkonfiguration. | Wenden Sie die für Ihre Real-time RT-PCR-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 Real-time RT-PCR-Plattform während der Datenkonfiguration.
- Wenden Sie die für Ihre Real-time RT-PCR-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 Real-time RT-PCR-Plattform während der Datenkonfiguration.
- Wenden Sie die für Ihre Real-time RT-PCR-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
R_n	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich

Symbol	Bedeutung des Symbols
	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 for 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
72-Well Rotor	Dient zur Aufnahme der Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, für Reaktionsvolumen von 10–50 µl	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Dient zur Befestigung der Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, im 72-Well Rotor	9018904

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	Anwendungserweiterung: Der Test wurde für asymptomatische Personen etabliert. Verwendungszweck wurde durch den Einschluss von Personen ohne Symptome oder sonstige Hinweise, die den Verdacht auf eine COVID-19-Infektion begründen, aktualisiert. Abschnitt zu klinischen Leistungsmerkmalen unter Einschluss asymptomatischer Personen wurde den Leistungsdaten hinzugefügt.
R3, September 2021	<p>Anwendungserweiterung:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ergänzung um das Testen von Speichelproben. 2. Überarbeitung des Arbeitsablaufs. 3. Zur Verwendung mit 3 zusätzlichen Plattformen und der jeweiligen Software: CFX96 Dx mit CFX Manager Dx Software, Version 3.1.3090.1022 (oder höher), cobas z 480 mit LightCycler 480 SW UDF, Version 2.0.0 (oder höher), und QuantStudio 5 Dx mit QuantStudio 5 Dx IVD Software, Version 1.0.1 (oder höher). 4. Die Nachweisgrenzen auf den 3 zusätzlichen Plattformen (CFX96 Dx, cobas z 480, QuantStudio 5 Dx) wurden im Abschnitt zur Leistung für nasopharyngeale, nasale und oropharyngeale Abstrichproben hinzugefügt. 5. Der Abschnitt „Leistungsmerkmale“ wurde aktualisiert. 6. Für das RGQ Gerät wurden nur die Fluoreszenzkanäle (Green, Red, Yellow) beibehalten (die Farbstoffnamen in Klammern wurden entfernt). 7. Für CFX96 Dx, ABI7500 Fast Dx, cobas z 480 und QuantStudio 5 Dx wurden nur die Farbstoffnamen beibehalten. 8. Für den ABI7500 Fast Dx wurden die Fluoreszenzfilter A/1, B/2 und E/5 entfernt. Nur die Farbstoffnamen (Fam, Vic und Cy5) wurden beibehalten. 9. Änderungen an den Tabellen 34 bis 37 im Abschnitt „Klinische Leistungsmerkmale“ zur Verdeutlichung der Ausführung.

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 zum Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Panel 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, zurückfordern, 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*®, Prep&Amp™, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CFX96™, Hard-Shell® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATtrol™ (Cole-Parmer); Colgate®, Total SF Whitening™ (Colgate-Palmolive Company); Listerine® (Johnson & Johnson); Tussidane® (Laboratoires Des Realisations Therapeutiques Elerte); PulmoFluide® (Laboratoires Gerda); Excel® (Microsoft Corporation); Ricola® (Ricola Group); cobas®, LightCycler® (Roche Group); ABI®, MicroAmp™, EnduraPlate™, QuantStudio®, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific oder Tochtergesellschaften); Altoids® (Wm. Wrigley Jr. Company). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

09/2021 HB-2850-003 © 2021 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

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