

RIDA® GENE Coronavirus

REF PG6805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE Coronavirus Test, der auf dem LightCycler® 480 II real-time PCR Gerät durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung von Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS-CoV aus unbehandelten humanen Nasen-/Rachenabstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE Coronavirus Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Coronaviren- (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS-CoV-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Coronaviren gehören zur Familie der Coronaviridae und sind einzelsträngige (ss) RNA-Viren. Aufgrund ihrer hohen genetischen Variabilität können einzelne Virusspezies die Artenbarriere überwinden und unterschiedliche Wirtsspezies infizieren. Beispiele dieser Artübertritte sind Infektionen mit SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) welche für die SARS-Pandemie 2002/2003⁽¹⁾ verantwortlich waren und dem 2012 neu aufgetretenen MERS-CoV (Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus)⁽²⁾.

SARS-CoV verursachen Symptome einer atypischen Pneumonie und haben während der Pandemie 2002/2003 über 1000 Todesopfer gefordert. Es wird vermutet, dass der ursprüngliche Reservoir-Wirt Schleichkatzen und Fledermäuse sind. Auch wenn die verschiedenen Übertragungswege nicht eindeutig geklärt sind, erfolgt die Übertragung primär über Tröpfcheninfektion. Auch eine Übertragung per Schmierinfektion oder über den fäkalen-oralen Weg kann nicht ausgeschlossen werden.

Bis 2015 wurden weltweit mehr als 1100 MERS-CoV Infektionen bestätigt und mehr als 420 MERS-CoV-assoziierte Todesfälle registriert^(3,4). Die Mehrheit der Fälle wurde auf der arabischen Halbinsel identifiziert. Auch für MERS ist der Ursprungswirt noch nicht eindeutig identifiziert, als primäre Übertragungsquelle werden jedoch Dromedare vermutet⁽⁵⁾. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Wochen treten zunächst grippeähnliche Symptome auf, wobei sich bei schweren Verläufen eine Pneumonie und akute Atemnot entstehen kann.

Neben SARS-CoV und MERS-CoV sind die verschiedenen humanpathogenen Coronaviren HKU1, NL63, 229E, OC43 Auslöser von leichten respiratorischen Infektionen bis hin zu schweren akuten Atemwegssyndromen⁽⁶⁾. Obwohl alle vier

Coronaviren global auftreten, werden sie in unterschiedlichen Regionen zu unterschiedlichen Jahreszeiten auf der Welt detektiert.

Das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) gehört zur Gattung Alphacoronavirus und ist zusammen mit dem humanen Coronavirus OC43 (HCoV-OC43, Gattung: Betacoronavirus) häufig für Erkältungskrankheiten verantwortlich⁽²⁾. Weitere Betacoronaviren sind SARS-CoV, MERS-CoV und Coronavirus HKU1. Letzterer wurde 2005 in einem hospitalisierten Patienten mit akutem respiratorischen Syndrom und Pneumonie in China diagnostiziert⁽⁷⁾.

Infektionen mit dem humanen Coronavirus NL63 (HCoV-NL63) ähneln denen von Parainfluenza-Infektionen. Das Virus wurde 2003 erstmalig in einem Kind mit Bronchiolitis in den Niederlanden entdeckt und wurde seitdem weltweit vor allem in jungen Kindern und immunsupprimierten Patienten mit Akutem Respiratorischen Syndrom nachgewiesen⁽⁸⁾.

3. Testprinzip

RIDA®GENE Coronavirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Coronaviren- (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS-CoV RNA. Nach der RNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von Coronaviren und MERS-CoV (ORF1) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Coronavirus Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 ×	700 µl	gelb, gebrauchsfertig
2	PP-Mix	1 ×	770 µl	hellgrün, gebrauchsfertig
3	Enzyme-Mix	1 ×	80 µl	rot, gebrauchsfertig
R	Internal Control RNA	2 ×	1800 µl	braun, gebrauchsfertig
N	PCR Water	1 ×	500 µl	weiß, gebrauchsfertig,
P	Positive Control	1 ×	100 µl	blau, gebrauchsfertig

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Bitte folgen Sie den Handhabungsvorgaben in Tabelle 2 und lagern Sie das Kit unmittelbar nach Verwendung gemäß den aufgeführten Angaben.
- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei +2 bis +8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 15 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (+2 bis +8 °C).

Tab. 2: Lagerungsbedingungen und -hinweise

	Lagertemperatur	Maximale Lagerzeit
ungeöffnet	-20 °C	Bis zum aufgedrucktem Verfallsdatum verwendungsfähig
geöffnet	-20 °C	15 Tau-/Frier-Zyklen

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Durchführung des RIDA®GENE Coronavirus Tests benötigt:

Reagenzien
PCR-Wasser (Nuklease-frei)

6.2 Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDA®GENE Coronavirus Tests benötigt:

Zubehör
Extraktionsplattform: Maxwell® RSC (Promega)
Real-time PCR Gerät: LightCycler® 480 II (Roche)
RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten (low profile, white wells, clear frame), Reaktionsgefäße, Folien)
Zentrifuge mit Rotor für Platten
Vortexer
Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
Pipettenspitzen mit Filtern
Puderfreie Einmalhandschuhe

Bei Fragen zur Verwendung von Geräten zur automatischen Abarbeitung wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG unter automation@r-biopharm.de.

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von qualifiziertem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.

Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.

In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken. Eine räumliche Trennung, gesonderte Kleidung und Instrumente für Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten um eine Querkontamination oder falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Vermeiden Sie eine Kontamination der Proben und der Komponenten des Kits mit Mikroben und Nukleasen (DNase / RNase).

Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.

Das Austauschen und Vermischen der Komponenten (Reaction Mix, PP-Mix Enzyme-Mix, Internal Control RNA, Positive Control, PCR Water) einer Kit-Charge mit den Komponenten einer anderen Charge ist untersagt.

Das Testkit darf nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS).

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Nasen- und Rachenabstrichen

Für die RNA-Präparation aus Abstrichen wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA[®]GENE Coronavirus Test enthält eine Internal Control RNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control RNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Prozesskontrolle (Extraktions- und Inhibitionskontrolle) eingesetzt werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle für die Amplifikation verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Nach Möglichkeit, empfehlen wir die **Internal Control RNA** dem Proben-Lysepuffer Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zu zufügen. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme-Mix**, die **Positive Control**, die **PCR Water** und die **Internal Control RNA** auftauen, vortexen (ausgenommen Enzyme-Mix) und kurz zentrifugieren. Reagenzien sind während der Arbeitsschritte stets geeignet zu kühlen (+2 bis +8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20,1 µl	221,1 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,1 µl	232,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl PCR Water zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® 480 II

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480 II	Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43)	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICR	533/580	
	MERS-CoV	618/660	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**¹ Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributor.

11. Interpretation der Ergebnisse

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			Ergebnis
Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV	ICR	
positiv	negativ	positiv/negativ	Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) nachweisbar
negativ	positiv	positiv/negativ	MERS-CoV nachweisbar
positiv	positiv	positiv/negativ	Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS-CoV nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Negativ (Zielgene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control RNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control RNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control RNA** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control RNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control RNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Der RIDA®GENE Coronavirus Test weist Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43)- RNA und MERS-CoV-RNA aus unbehandelten humanen Nasen/Rachenabstrichen nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Ct-Werts und dem Auftreten schwerer klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.
2. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
3. Dieser Test ist nur für unbehandelten humanen Nasen/Rachenabstrichen verifiziert.
4. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter der Nachweisgrenze (LoD 95 %) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE Coronavirus zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
8. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene (ORF1) vorhanden sind.
9. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Good Laboratory Practice) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE Coronavirus multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) und MERS-CoV (s. Abb. 1, Abb. 2).

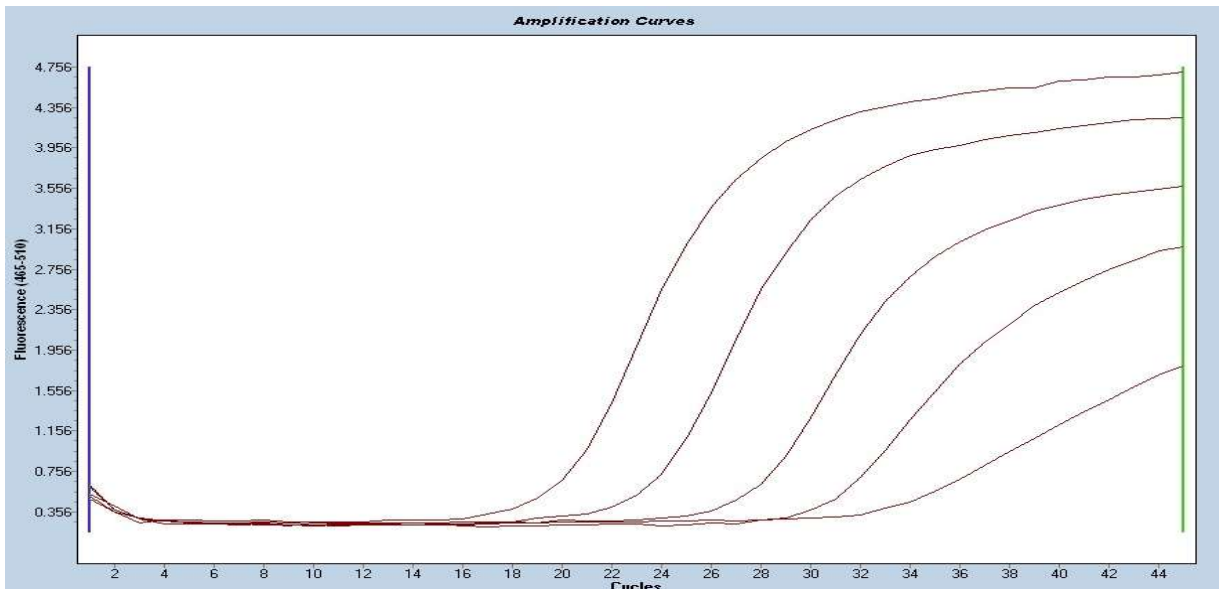


Abb. 1: Verdünnungsreihe Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43) (10^5 - 10^1 RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480 II

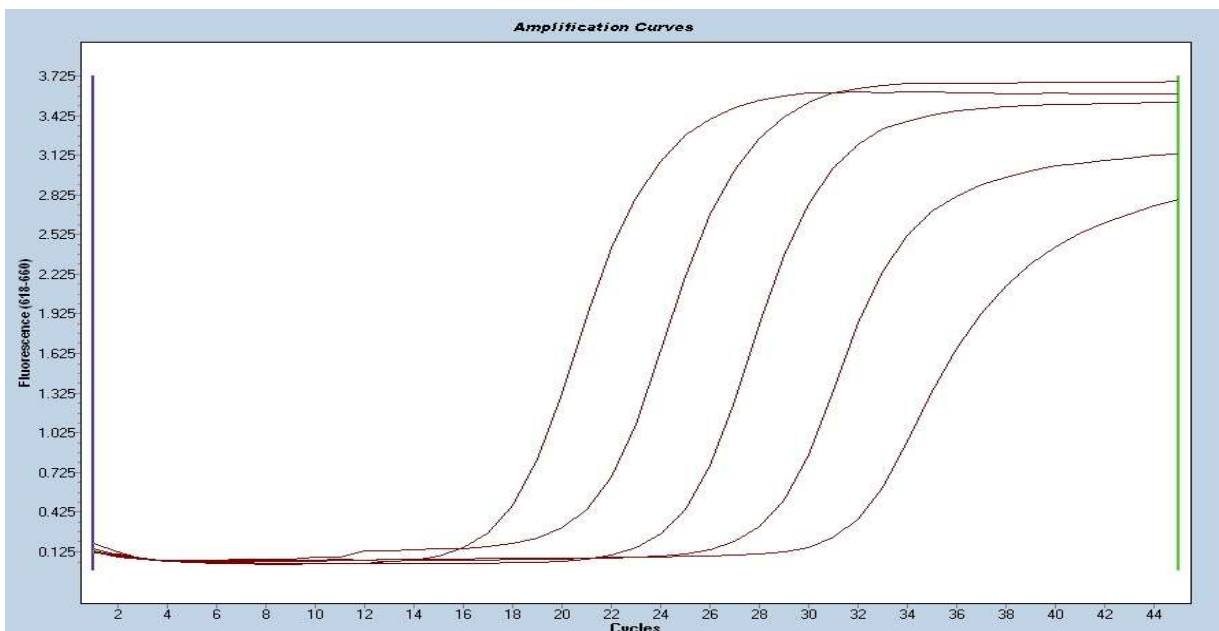


Abb. 2: Verdünnungsreihe MERS (10^5 - 10^1 RNA Kopien/ μ l) dem LightCycler[®] 480 II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, RNA-Extraktion und dem RNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Coronavirus real-time RT-PCR ist spezifisch für Coronaviren. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 9):

Tab. 9: Potentiell kreuzreaktive Organismen

Organismus	Testergebnis	
	Coronaviren (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV
<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	negativ	negativ
Adenovirus	negativ	negativ
Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	negativ	negativ
Adenovirus 7, Human, strain Gomen	negativ	negativ
Adenovirus 40, Human, strain Dugan	negativ	negativ
Adenovirus 41, Human, strain Tak	negativ	negativ
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negativ	negativ
<i>Arcobacter butzleri</i>	negativ	negativ
Astrovirus	negativ	negativ
<i>Bacillus cereus</i>	negativ	negativ
<i>Bacteroides fragilis</i>	negativ	negativ
<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	negativ	negativ
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativ	negativ
<i>Campylobacter coli</i>	negativ	negativ
<i>Campylobacter jejuni</i>	negativ	negativ
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	negativ	negativ
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	negativ	negativ
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	negativ	negativ
<i>Candida albicans</i>	negativ	negativ
<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	negativ	negativ
<i>Clostridium bifermentans</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium difficile</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium perfringens</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium sporogenes</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium septicum</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium novyi</i>	negativ	negativ
<i>Clostridium sordellii</i>	negativ	negativ
<i>E. coli</i> (O26:H-)	negativ	negativ
<i>E. coli</i> (O6)	negativ	negativ

<i>E. coli</i> (O157:H7)	negativ	negativ
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativ	negativ
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativ	negativ
Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	negativ	negativ
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	negativ	negativ
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	negativ	negativ
Herpes simplex virus 2 strain MS	negativ	negativ
Human Metapneumovirus	negativ	negativ
Human Coxsackie B4	negativ	negativ
Human Cytomegalovirus	negativ	negativ
Human parainfluenza virus 1 strain C35	negativ	negativ
Human parainfluenza virus 2 strain Greer	negativ	negativ
Human parainfluenza virus 4b strain CH19503	negativ	negativ
Human parainfluenza virus serotype 3	negativ	negativ
Human respiratory syncytial virus strain Long	negativ	negativ
Human respiratory syncytial virus strain 9320	negativ	negativ
Human Rhinovirus Genogruppe A	negativ	negativ
Influenza virus infectious A/PR/8/34	negativ	negativ
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	negativ	negativ
<i>Klebsiella oxytoca</i>	negativ	negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	negativ	negativ
<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	negativ	negativ
<i>Proteus vulgaris</i>	negativ	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	negativ
Rotavirus	negativ	negativ
<i>Salmonella enteritidis</i>	negativ	negativ
<i>Salmonella typhimurium</i>	negativ	negativ
<i>Serratia liquefaciens</i>	negativ	negativ
<i>Shigella flexneri</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	negativ

<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	negativ	negativ
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	negativ	negativ
<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	negativ	negativ
Varicella Zoster Virus (Type B)	negativ	negativ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negativ	negativ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negativ	negativ

Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von RT-PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht.

Substanzen, die möglicherweise die Testergebnisse signifikant beeinflussen könnten, wurden zunächst in einem Interferenz-Screen untersucht. Dabei wurden verschiedene Substanzen, die entweder als Rückstand der Extraktion, aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen (verschiedene apotheken- oder verschreibungspflichtige Medikamente) oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Kontrollproben (z.B. Muzine, die sich auf der Oberfläche von Schleimhäuten befinden oder Blut) vorhanden sein könnten, zunächst in hohen Konzentrationen (dreifache Tagesdosis oder Simulation des „worst case“) überprüft. Wurde in diesem Interferenz-Screen bei einer untersuchten Substanz eine mögliche Interferenz festgestellt, wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Konzentration der betreffenden Substanz und der Interferenz hergestellt werden. Für die in Tabelle 10 aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt.

Tab. 10: Potentiell interferierende Substanzen

Potentiell interferierende Substanz	Konzentration
Ciprofloxacin 500 mg (Ciprofloxacin)	25 mg/ml
Ampicillin	25 mg/ml
ratioAllerg 50µg (Beclomethasondipropionat)	10 % [v/v]
Humanblut	2 % [v/v]
Erythromycin	10 % [v/v]
Flutide Nasal (Fluticasonpropionat)	25 mg/ml
Robitussin (Guaifenesin/Dextromethorphan)	10 % [v/v]
Chloraseptic® Sore Throat Spray (Phenol)	10 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Natriumchlorid	10 % [v/v]
Nasivin 0,05% (Oxymetazolin)	10 % [v/v]
Tobramycin	4 µg/ml
Oseltamivirphosphat	25 mg/ml

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Coronavirus multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Subtypen des Coronavirus untersucht (s. Tab. 11). Coronavirus Subtypen des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Coronavirus multiplex real-time RT-PCR nachgewiesen. Die Reaktivität des Subtyps HKU1 wurde mittels Sequenzabgleich analysiert.

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm - Subtyp	Konzentration	Ergebnis	
		Coronavirus	MERS
Coronavirus - HKU1	*	positiv	negativ
Coronavirus - OC43	1,5x10 ⁻¹ U/ml	positiv	negativ
Coronavirus - NL63	1,2x10 ⁻¹ U/ml	positiv	negativ
Coronavirus - 229E	1,2x10 ⁰ U/ml	positiv	negativ
Coronavirus - MERS	1,0x10 ⁻⁵ U/ml	negativ	positiv










*Analytische Reaktivität zu Coronavirus HKU1 wurde über eine BLAST-Analyse nachgewiesen.

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-09-20	Vorversion
2021-08-13	Generelle Überarbeitung: 1. Zweckbestimmung 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale
2022-04-19	6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör (RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004))

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Reaction Mix	Reaktions-Mix
PP-Mix	Primer/Probe-Mix
Enzyme-Mix	Enzyme-Mix
Internal Control RNA	Extraktions- / Inhibitionskontrolle
PCR Water	Negativkontrolle
Positive Control	Positivkontrolle

16. Literatur

1. World Health Organization Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) multi-country outbreak - Update 6 http://www.who.int/csr/don/2003_03_21/en/ accessed 28.07.2015
2. To K.W. et al. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* 2013; 5 (S2):S103-S108.
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV) – Saudi Arabia <http://www.who.int/csr/don/29-april-2015-mers-saudi-arabia/en/> accessed 30.07.2015
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: severe respiratory illness associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)–worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62:480–483
5. Adney DR et al. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1999–2005
6. US Centers for Disease Control and Prevention. MERS clinical features [cited 2015 May 30]. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/clinical-features.html> accessed 30.07.2015
7. Woo PC et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
8. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 368-373.