

RIDA® GENE SARS-CoV-2

REF PG6815



Deutsch	3
English.....	19
Español.....	33
Français.....	49
Italiano	65
Português	81

RIDA®GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Zweckbestimmung

Für die in-vitro Diagnostik. Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test, der auf dem Roche LightCycler® 480II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanem Nasen-/Rachenabstrich von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von SARS-CoV-2-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für den Einsatz durch Fachanwender in Krankenhauslaboren, Referenzlaboren, Privatlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Ende Dezember traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.¹ Anfang Januar konnte von chinesischen Behörden ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Ursache dieser Erkrankungen identifiziert werden.¹ Die durch SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit erhielt den offiziellen Namen COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) und ist von Mensch zu Mensch übertragbar.²

Weltweit wurden bereits 3.925.815 Fälle gemeldet (Stand: 10.05.2020).³ Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden. Deutschlandweit wurden bereits 169.575 Fälle gemeldet (Stand: 11.05.2020).^{4,5} Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.^{1,5}

In den ursprünglichen Leitlinien der WHO wird eine Drei-Target Strategie empfohlen.⁶ Als diese Leitlinie erstellt wurde, lagen nicht genügend Sequenzinformationen für SARS-CoV-2 vor, sodass die von der WHO veröffentlichten Sequenzbereiche einzeln in den Target-Genbereichen nicht spezifisch genug für die Detektion von SARS-CoV-2 RNA waren. Um die Spezifität der Tests für SARS-CoV-2 zu erhöhen

wurde dementsprechend eine Drei-Target Strategie verfolgt. Am 17. Januar 2020 wurde diese Drei-Target Strategie auf eine Zwei-Target Strategie reduziert, da das dritte Target eine unzureichende Sensitivität aufwies.

Am 17. März 2020 gab die WHO vorläufige Leitlinien für die Diagnostik von Verdachtsfällen bei einer, durch SARS-CoV-2 verursachten, Coronavirus-Erkrankung (COVID-19) in Hinblick auf die Anforderungen für molekularbiologische Laborteste heraus, in denen es heißt: „In Gebieten, in denen das COVID-19-Virus weit verbreitet ist, wird die Verwendung eines einfacheren Algorithmus wie beispielsweise der Detektion eines einzelnen spezifischen SARS-CoV-2 Targets (Ein-Target Strategie) mittels real-time RT-PCR als ausreichend angesehen.“

Die R-Biopharm AG hat bei der Entwicklung des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time RT-PCR Assays von Beginn an die Ein-Target Strategie verfolgt. Unser Ziel war es einen sensitiven und spezifischen SARS-CoV-2 Nachweis mit optimierten Workflow, d.h. ohne weitere notwendige Bestätigung zu etablieren. Dies war zu diesem Zeitpunkt bereits möglich da eine Vielzahl von Genomsequenzen des neuartigen Coronavirus SARS CoV-2 zur Verfügung standen. Im Rahmen von Genomanalysen konnten wir einen Bereich innerhalb des E-Gens identifizieren, welcher spezifisch für SARS-CoV-2 ist. Dieser Bereich liegt etwa 200 Basenpaare downstream von dem WHO publizierten unspezifischen Bereich des E-Gens von SARS-CoV-2. Durch den Nachweis dieses spezifischen E-Genbereichs konnte die R-Biopharm AG dementsprechend die Detektion von SARS-CoV-2 RNA auf nur ein Target reduzieren.

3. Testprinzip

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanem Nasen-/Rachenabstrich von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer respiratorischen Infektion.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR-Format, d.h. die Reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für SARS-CoV-2 (E-Gen) werden anschließend mittels real-time PCR 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 SARS-CoV-2 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	2x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- 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 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 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 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR wurde mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Gerät Kombination verifiziert:

Tab.2a: Benötigtes Zubehör (verifiziert)

Extraktionsplattformen	
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II

Des Weiteren ist der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR Test kompatibel für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2b: Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem 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 von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.

- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben

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

Der RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 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 Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control RNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control RNA je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA je Probe

während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control RNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen, je 1 µl pro Reaktion der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

Weitere Informationen zur Sammlung, Lagerung und zum Transport der Proben siehe WHO Interim guidance, 2 March 2020

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

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 **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 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	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 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	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 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: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

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

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

Positivkontrolle: 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 1 µl der Internal Control RNA** zum RT-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, Tab. 7).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

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

<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.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 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. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Green	-
	ICR	Yellow	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

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. 8: 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	Nicht nachweisbar

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

Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind valide, wenn sie den in der Tabelle angegebenen Bedingungen entsprechen. Der Ct-Bereich für die Positivkontrolle ist auf dem Produkt beigelegten Quality Assurance Certificate angegeben. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht die Bedingungen für einen validen Lauf erfüllen, 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

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von		
SARS-CoV-2	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

SARS-CoV-2 ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA und die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

SARS-CoV-2 ist ebenfalls nachweisbar, 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.

SARS-CoV-2 ist nicht nachweisbar, 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.

Die Gerätenachweisgrenze, mit dem LightCycler® 480II, des RIDA®GENE Assay liegt bei > 50 Kopien / Reaktion. Proben mit einem CT-Wert von > 35 liegen im Bereich der Nachweisgrenze. Hierbei muss beachtet werden, dass die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens von der Probenmatrix, dem Cycler und der RNA-Extraktion abhängig ist und dementsprechend variieren kann. Daher wird empfohlen, diese Proben als nicht eindeutig zu bewerten, die einzelnen Kurvenverläufe auf einen sigmoiden Verlauf zu prüfen und unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik eine entsprechende Verlaufskontrolle anzufordern. Eine Beurteilung dieser Proben obliegt dem entsprechend geschulten Personal.

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für humane respiratorische Proben geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
4. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE SARS-CoV-2 zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
6. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zielgen (E-Gen) vorhanden ist.

7. 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 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480II unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in Duplikaten an 10 Arbeitstagen von unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Inter-Lot Präzision: Die Testungen zur Intra- und Inter-Assay Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test auf dem LightCycler® 480II lagen unter 3 %.

13.2 Analytische Sensitivität

13.2.1 Gerätenachweisgrenze

Zur Ermittlung der Gerätenachweisgrenze wurden 20 Replikaten einer Kontrollprobe (50 Kopien/Reaktion) mit dem LightCycler® 480II gemessen. Alle Replikate wurden positiv bestimmt.

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

13.2.2 Nachweisgrenze (LoD 95 %)

Die Nachweisgrenze des RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Tests wurde innerhalb einer externen Studie unter Verwendung des MagNaPure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit und dem LightCycler® 480II ermittelt. Die hier ermittelte LoD 95 % für den RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test beträgt 4,3 Kopien / ml.⁷

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

13.3 Analytische Spezifität

Der RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR Test ist spezifisch für humanes SARS-CoV-2 aus Nasen-Rachenabstrich. Ein Sequenz-Abgleich mit Hilfe von bestehenden Nukleotid-Datenbanken (National Center for Biotechnology Information,

NCBI) zeigte eine Spezifität für SARS-CoV-2 und keine signifikante Homologie zu anderen Organismen.

Weiterhin wurden verschiedene Organismen getestet. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10):

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

Human Coronavirus 229E	-	Parainfluenza 1 (strain C35)	-	Enterovirus (Type 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Human Coronavirus OC43	-	Parainfluenza 2 (strain Greer)	-	RSV (strain Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Human Coronavirus NL63	-	Parainfluenza 3	-	RSV (strain 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, strain CH19503)	-	Rhinovirus (Genogruppe A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovirus 7, Human (strain Gomen)	-	Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 1, Human (strain Adenoid 71)	-	Influenza B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Human Metapneumovirus	-	Influenza Virus B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Analytische Reaktivität

Die analytische Reaktivität der RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR wurde an Hand der Ringversuchsprobe INSTAND e.V. RV 340059 nachgewiesen (s. Tab. 11).

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 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 (s. Tab. 12).

Tab. 12: Interferierende Substanzen

Wirkstoff / Pharmazeutikum	Konzentration
Ethanol	5 % [v/v]
Guanidinhydrochlorid	5 % [w/v]
Azithromycin	84 mg/mL
Mucine	60 µg/mL
Xylomethazolin/Nasenspray ratiopharm®	10 % [v/v]
Beclomethasondipropionat	10 % [v/v]
Paracetamol	10 mg/mL
Amoxicillin	1 mg/mL
Humanblut	2 % [v/v]
Dihydrocodein	10 % [v/v]









Die in Tabelle 12 aufgeführten Substanzen zeigten bei den jeweils getesteten Konzentrationen keine interferierende Wirkung.

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-05-15	Vorversion
2020-06-17	Generelle Überarbeitung: 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 5. Reagenzien und ihre Lagerung 11. Interpretation der Ergebnisse 13. Leistungsmerkmale
2020-07-27	Änderung in der spanischen Gebrauchsanweisung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)

RIDA®GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. The RIDA®GENE SARS-CoV-2 test, which will be performed on the Roche LightCycler® 480II, is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection of coronavirus (SARS-CoV-2) RNA from human throat and nasopharyngeal swabs of people with symptoms of a respiratory infection.

The RIDA®GENE SARS-CoV-2 test is designed to support the differential diagnosis of SARS-CoV-2 infections in patients with symptoms of respiratory infection in conjunction with other clinical and laboratory findings.

Negative results do not rule out infection with SARS-CoV-2 and should not be used as the sole basis for diagnosis.

The product is intended for use by professional users in hospital laboratories, reference laboratories, private laboratories or state laboratories.

2. Summary and explanation of the test

At the end of December in the Chinese metropolis of Wuhan, numerous cases of pneumonia of unknown cause occurred.¹ At the beginning of January, Chinese authorities identified a new type of corona virus (SARS-CoV-2) as the cause.¹ The disease caused by SARS-CoV-2 is officially named COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) and is transmissible from person to person.²

Worldwide, 3,925,815 cases have been reported (as of May 10, 2020).³ The initial cases in Germany were confirmed at the end of January 2020.⁴ In Germany 169,575 cases have been reported (as of May 11, 2020).^{4,5} The WHO declared an international health emergency on January 31, 2020.^{1,5}

The original WHO guidelines recommended a three-target strategy.⁶ When this guideline was prepared, there was insufficient sequence information for SARS-CoV-2, so that the sequence ranges published by the WHO in the individual target gene regions were too non-specific for reliable detection of SARS-CoV-2 RNA. In order to increase the specificity of the tests for SARS-CoV-2, a three-target strategy was pursued accordingly. On 17 January 2020, this three-target strategy was reduced to a two-target strategy because the third target had insufficient sensitivity.

On 17 March 2020, the WHO issued interim guidance for the diagnosis of suspected cases of coronavirus disease (COVID-19), caused by SARS-CoV-2, with regard to the requirements for molecular biological laboratory tests, which states: “In areas where the COVID-19 virus is widely spread, a simpler algorithm might be adopted in which, for example, screening by real-time RT-PCR of a single discriminatory SARS-CoV-2 target (single-target strategy) is considered sufficient.”

In developing the RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time RT-PCR assay, R-Biopharm AG has followed the single-target strategy right from the start. Our goal was to establish sensitive and specific detection of SARS-CoV-2 with an optimised workflow, i.e. without any further necessary confirmation. This was possible even at this point in time because a large number of genome sequences of the novel coronavirus SARS CoV-2 were available. In the course of genome analyses, we were able to identify a region within the E gene which is highly specific to SARS-CoV-2 and which has high sensitivity for screening purposes. This region is located about 200 base pairs downstream of the non-specific region of the E gene of SARS-CoV-2 published by the WHO. In detecting this specific E gene region, we were thus able to reduce the detection of SARS-CoV-2 RNA to only one target.

3. Test principle

RIDA®GENE SARS-CoV-2 is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection of coronavirus (SARS-CoV-2) RNA from human throat and nasopharyngeal swabs of people with symptoms of a respiratory infection.

Detection is done in a one-step real-time RT-PCR format: reverse transcription (RT) and subsequent PCR take place in one reaction vial. In the process, the isolated RNA is transcribed into cDNA with the help of a reverse transcriptase. The specific gene fragments for SARS-CoV-2 (E gene) are then amplified using real-time PCR. The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled at one end with a quencher and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, the Taq-Polymerase separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR device. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA®GENE SARS-CoV-2 test contains an Internal Control RNA (ICR) to be able to control sample preparation and/or any potential PCR inhibition.

4. Reagents provided

Table 1: Reagents provided (The reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations.)

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	red
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brown
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C - 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 20 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR test was verified with the following extraction platform and real-time PCR device combination:

Table 2a: Necessary equipment (verified)

Extraction platforms	
Promega	Maxwell®RSC
Real-time PCR devices	
Roche	LightCycler®480II

Furthermore, the RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR test is compatible for use with the following extraction platforms and real-time PCR devices:

Table 2b: Necessary equipment (compatible)

Extraction platforms	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Real-time PCR devices	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: When using Rotor-Gene Q (QIAGEN), use only 0.1 ml tubes.

Should you have to use other extraction procedures or real-time PCR instruments, please contact R-Biopharm AG to check the compatibility at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) when using LightCycler® 480II
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with rotor for reaction vials or plates
- Vortexer
- Pipettes (0.5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl)
- Pipette tips with filters
- Powder-free disposable gloves
- PCR water (nuclease-free)

7. Precautions for users

- This test must be carried out only by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.
- Always adhere strictly to the user instructions for carrying out this test.
- Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.
- Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.
- Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.
- Ensure that the extraction, PCR preparation, and PCR are carried out in different rooms in order to avoid cross-contaminations.
- Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.
- Dispose of test kit once the expiration date has lapsed.
- Users are responsible for proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

For further details, see the safety data sheets (SDSs) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 RNA preparation from human respiratory samples

A commercially available nucleic acid extraction kit (e.g., RIDA[®]Xtract (R-Biopharm AG)) or nucleic acid extraction system (e.g., Maxwell[®]RSC (Promega)) is recommended for RNA preparation from human respiratory samples. The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 test contains an **Internal Control RNA** that indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control RNA** can be used either only as an inhibition control or as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as an inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** must be added to the master mix for each reaction (see Table 4).

If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation **and** as an inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** must be used for each sample during extraction. The **Internal Control RNA** should be added to the sample/lysis buffer mix and should **not** be added directly to the sample material. We recommend adding 1 µl for each reaction of the **Internal Control RNA** to the PCR mix of the negative control and the positive control.

For more information on the collection, storage and transport of samples, see WHO Interim guidance, 2 March 2020 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Test procedure

9.1 Master Mix preparation

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive control and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the master mix is recommended in order to balance out the pipette loss (see Table 3, Table 4). Before using the **Reaction Mix**, thaw the **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control**, and **Internal Control RNA**, mix thoroughly and centrifuge for a short time. Always cool reagents appropriately during work steps (2 °C - 8 °C).

Table 3: Example of the calculation and preparation of the master mix for 10 reactions (ICR as extraction and inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

Table 4: Example of the calculation and production of the master mix for ten (10) reactions (ICR only as inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

9.2 Preparation of the PCR Mix

Pipette 20 µl of the master mix into each reaction vial (vial/plate).

Negative control: Pipette 5 µl of the **No Template Control** into the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl eluate to the pre-pipetted master mix.

Positive control: Add 5 µl of the **Positive Control** to the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR mix of the positive control.

Seal the reaction vials or plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer into the real-time PCR device. Start PCR according to PCR instrument set-up (see Table 5, Table 6, Table 7).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time PCR profile

Table 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® 480II and RIDA®CYCLER

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Table 6: Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, and CFX96™ Dx

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Note: **The universal real-time PCR profile can also be used for DNA tests if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR tests are combined in one run.**

9.4 Detection channel setting

Table 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Comment
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Green	-
	ICR	Yellow	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Set the reference dye to none.
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Set the ROX passive reference dye to none.
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor- Gene Q	SARS-CoV-2	Green	The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	Yellow	

10. Quality control

Samples are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR device according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls must show the correct results (see Table 8).

The **Positive Control** comes at a concentration of 10^3 copies/ μ l. It is used in a total quantity of 5×10^3 copies in every PCR run.

Table 8: A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICR Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	Not detectable

*1 A Ct value for the ICR is not needed to obtain a positive result of the positive control.

The positive and negative controls are valid when they meet the conditions specified in the table. The Ct range for the positive control is specified on the Quality Assurance Certificate included with the product. If one of the two controls does not meet the conditions for a valid run, all the reactions need to be re-analyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the devices used
- Correct test procedure

11. Sample interpretation

The results interpretation is done according to table 9.

Table 9: Sample interpretation

Detection of		
SARS-CoV-2	ICR	Result
positive	positive/ negative	SARS-CoV-2 detectable
negative	positive	Target gene not detectable
negative	negative	Invalid

SARS-CoV-2 is detectable if the sample RNA and the **Internal Control RNA** show an amplification signal in the detection system.

SARS-CoV-2 is also detectable if the RNA shows an amplification signal, but no amplification signal can be seen for the **Internal Control RNA** in the detection system. Detecting the **Internal Control RNA** is not necessary in this case because high amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the **Internal Control RNA**.

SARS-CoV-2 is not detectable if the RNA shows no amplification signal, but an amplification signal can be seen for the **Internal Control RNA** in the detection system. Inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the **Internal Control RNA**.

A sample is invalid if the sample RNA and the **Internal Control RNA** do not show an amplification signal in the detection system. There are PCR inhibitors in the sample, or an error occurred during the extraction process. The extracted sample should be diluted 1:10 with PCR water and re-amplified, or the isolation and purification of the sample should be improved.

The detection limit of the RIDA[®]GENE assay, using the LightCycler[®] 480II, is > 50 copies/reaction. Samples with a CT value of > 35 are within the detection limit. It should be noted that the detection limit of the RT-PCR depends on the sample matrix, the Cycler and the RNA extraction and can vary accordingly. We therefore recommend that these samples be assessed as inconclusive, examine the individual curves for sigmoidity and requesting a corresponding follow-up sample taking into account the clinical symptoms. The appropriately trained personnel are responsible for assessing these samples.

12. Limitations of the method

1. This test is intended only for human respiratory samples.
2. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false negative results.
3. The presence of PCR inhibitors can lead to non-evaluable results.
4. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false negative results using RIDA[®]GENE SARS-CoV-2.
5. As with all PCR-based *in vitro* tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
6. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the target gene (E gene) is present.
7. This assay should be performed according to GLP (Good Laboratory Practice). The user must follow the manufacturer's instructions closely when performing the test.

13. Performance characteristics

13.1 Precision

The precision of the RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR test was determined for the following observation levels.

Intra-assay precision: Determination of 5 control samples with 20 replicates each on the LightCycler® 480II under identical conditions.

Inter-Assay Precision: Determination of 5 control samples in duplicates over 10 working days by different operators under reproducible conditions.

Inter-Lot Precision: The tests for intra- and inter-assay precision are carried out on three different lots.

The variation coefficients obtained for the respective measurements with the RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR test on the LightCycler® 480II were below 3 %.

13.2 Analytical sensitivity

13.2.1 Device detection limit

To determine the device detection limit, 20 replicates of a control sample (50 copies / reaction) were measured with the LightCycler® 480II. All replicas were positive. The device detection limit is therefore 50 copies / reaction.

13.2.2 Limit of detection (LoD 95 %)

The detection limit of the RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR test was determined in an external study using the MagNaPure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit and the LightCycler® 480II. The LoD 95 % determined here for the RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR test is 4.3 copies / ml.⁷

The detection limit of the overall procedure depends on the sample matrix, the Cycler and the RNA extraction.

13.3 Analytical specificity

The RIDA®GENE SARS-CoV-2 real-time PCR test is specific for human SARS-CoV-2 from nasopharyngeal swab. Sequence matching using existing nucleotide databases (National Center for Biotechnology Information, NCBI) showed specificity for SARS-CoV-2 and no significant homology to other organisms.

Various organisms were also tested. No cross-reactivities to the following species were found (see Table 10):

Table 10: Cross-reactivity testing

Human Coronavirus 229E	-	Parainfluenza 1 (strain C35)	-	Enterovirus (Type 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Human Coronavirus OC43	-	Parainfluenza 2 (strain Greer)	-	RSV (strain Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Human Coronavirus NL63	-	Parainfluenza 3	-	RSV (strain 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, strain CH19503)	-	Rhinovirus (Genogruppe A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovirus 7, Human (strain Gomen)	-	Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 1, Human (strain Adenoid 71)	-	Influenza B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Human Metapneumovirus	-	Influenza Virus B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Analytical reactivity

The analytical reactivity of the RIDA®GENE SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR was demonstrated using the proficiency test INSTAND e.V. RV 340059 (see Table 11).

Tab. 11: Analytical reactivity

SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Interfering substances

The presence of RT-PCR inhibitors and interfering substances can lead to false negative or invalid results. Therefore, the effects of various substances that could be present in the corresponding samples due to widespread use in respiratory infections or widespread occurrence were examined (see Table 12).

Tab. 12: Interfering substances

Active ingredient / pharmaceutical	Concentration
Ethanol	5 % [v/v]
Guanidine hydrochloride	5 % [w/v]
Azithromycin	84 mg/mL
Mucine	60 µg/mL
Xylometazoline / nasal spray ratiopharm®	10 % [v/v]
Beclometasone dipropionate	10 % [v/v]
Paracetamol	10 mg/mL
Amoxicillin	1 mg/mL
Human blood	2 % [v/v]
Dihydrocodeine	10 % [v/v]









The substances listed in Table 12 showed no interfering effect at the concentrations tested.

14. Version history

Version number	Section and designation
2020-05-15	Previous version
2020-06-17	General revision: 2. Summary and explanation of the test 5. Storage instructions 11. Sample interpretation 13 Performance characteristics
2020-07-27	Revision of the spanish Instruction for Use 2. Summary and explanation of the test

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture

Test-specific symbols

Not applicable

16. References

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)

RIDA®GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2, que se realizará en el Roche LightCycler® 480II, es una RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa del ARN del coronavirus (SARS-CoV-2) a partir de hisopos de orofaringe y nasofaringe de personas con síntomas de una infección respiratoria.

El ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2 está diseñado para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas de infección respiratoria junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el diagnóstico.

El producto está previsto para ser utilizado por profesionales que trabajan en laboratorios hospitalarios, laboratorios de referencia, laboratorios privados o laboratorios del Estado.

2. Resumen y descripción del ensayo

A finales de diciembre en la metrópoli china de Wuhan, ocurrieron numerosos casos de neumonía de causa desconocida.¹ A principios de enero, las autoridades chinas identificaron un nuevo tipo de coronavirus (SARS-CoV-2) como la causa.¹

La enfermedad causada por el SARS-CoV-2 se denomina oficialmente COVID-19 ("Enfermedad del Coronavirus 2019") y es transmisible de persona a persona.²

En todo el mundo, se han notificado 3 925 815 casos (al 10 de mayo de 2020).³ Los casos iniciales en Alemania se confirmaron a finales de enero de 2020.⁴ En Alemania se han notificado 169 575 casos (hasta el 11 de mayo de 2020).^{4,5} La OMS declaró una emergencia sanitaria internacional el 31 de enero de 2020.^{1,5}

Las directrices originales de la OMS recomendaban una estrategia de tres objetivos.⁶ Cuando se preparó esta guía, no había suficiente información sobre la secuencia del SARS-CoV-2, de modo que los rangos de secuencia publicados por la OMS en las regiones individuales de genes diana eran demasiado inespecíficos para la detección fiable del ARN del SARS-CoV-2. Para aumentar la especificidad de los ensayos para SARS-CoV-2, se siguió una estrategia de tres objetivos en

consecuencia. El 17 de enero de 2020, esta estrategia de tres objetivos se redujo a una estrategia de dos objetivos porque el tercer objetivo tenía una sensibilidad insuficiente.

El 17 de marzo de 2020, la OMS emitió una guía provisional para el diagnóstico de casos sospechosos de la enfermedad por coronavirus (COVID-19), causada por el SARS-CoV-2, con respecto a los requisitos para los ensayos de laboratorio de biología molecular, que establece: "En áreas donde el virus COVID-19 está ampliamente diseminado, se podría adoptar un algoritmo más simple en el que, por ejemplo, el cribado por RT-PCR en tiempo real de un solo objetivo discriminatorio de SARS-CoV-2 (estrategia de un solo objetivo) se considera suficiente".

Al desarrollar el ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA® GENE SARS-CoV-2, R-Biopharm AG siguió la estrategia de un solo objetivo desde el principio. Nuestro objetivo era establecer una detección sensible y específica de SARS-CoV-2 con un flujo de trabajo optimizado, es decir, sin ninguna confirmación adicional necesaria. Esto fue posible incluso en este momento porque una gran cantidad de secuencias del genoma del nuevo coronavirus SARS CoV-2 estaban disponibles. En el curso de los análisis del genoma, pudimos identificar una región dentro del gen E que es altamente específica para el SARS-CoV-2 y que tiene una alta sensibilidad para fines de cribado. **Esta región se encuentra a unos 200 pares de bases en dirección 3' de la región inespecífica del gen E del SARS-CoV-2 publicada por la OMS.** Al detectar esta región específica del gen E, pudimos reducir la detección de ARN del SARS-CoV-2 a un solo objetivo.

3. Principio del ensayo

El ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2 es una RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa del ARN del coronavirus (SARS-CoV-2) a partir de hisopos de orofaringe y nasofaringe de personas con síntomas de una infección respiratoria.

La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) va seguida de la PCR en un vial de reacción. En el proceso, el ARN aislado se transcribe en ADNc con la ayuda de una transcriptasa inversa. Luego, los fragmentos de genes específicos para SARS-CoV-2 (gen E) se amplifican mediante PCR en tiempo real. Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis que están marcadas en un extremo con un inhibidor y con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polimerasa separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rojo
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	café
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 °C - 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 se verificó con la siguiente combinación de plataforma de extracción y dispositivo de PCR en tiempo real:

Tabla 2a: Equipo necesario (verificado)

Plataformas de extracción	
Promega	Maxwell®RSC
Dispositivos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler®480II

Además, el ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 es compatible para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y dispositivos de PCR en tiempo real:

Tabla 2b: Equipo necesario (compatible)

Plataformas de extracción	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Dispositivos de PCR en tiempo real	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Al utilizar el Rotor-Gene Q (QIAGEN), use únicamente tubos de 0,1 ml.

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm AG para comprobar la compatibilidad en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) al usar el LightCycler[®] 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

- Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Seguir siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.
- Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.
- No fume, coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.
- Asegúrese de que la extracción, la preparación de PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.
- Deseche el kit de ensayo cuando alcance la fecha de caducidad.

- Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Para obtener información más detallada, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación del ARN a partir de muestras respiratorias humanas

Para la preparación de ARN a partir de muestras respiratorias humanas, se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej., RIDA®Xtract [R-Biopharm AG]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, Maxwell®RSC [Promega]) que estén disponibles en el mercado. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control RNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras **y** como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control RNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control RNA** debe añadirse a la mezcla de muestra y tampón de lisado, y **no** directamente al material de muestra.

Se recomienda añadir 1 µl por cada reacción del **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR de control negativo y a la de control positivo.

Para obtener más información sobre la recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras, consulte la Guía provisional de la OMS, 2 de marzo de 2020 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Antes de usar la **Reaction Mix**, descongele la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA**, mezcle bien y centrifugue por un corto tiempo. Refrigere siempre los reactivos de forma adecuada durante las etapas del trabajo (2 °C- 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

Tabla 4: Ejemplo del cálculo y la producción de la mezcla maestra para diez (10) reacciones (ICR solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (vial/placa).

Control negativo: Pipetee 5 µl del **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Añada 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl del **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Selle los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo con la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6 y 7).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® 480II y RIDA®CYCLER

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q y CFX96™ Dx

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Nota: El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Verde	-
	ICR	Amarillo	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Establezca el colorante de referencia en "none" (ninguno).
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Verde	La ganancia debe establecerse en 5 (predeterminado de fábrica) para todos los canales.
	ICR	Amarillo	

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8).

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

Tabla 8: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

*1 No es necesario tener un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.

Los controles positivo y negativo son válidos cuando cumplen las condiciones especificadas en la tabla. El rango de Ct para el control positivo se especifica en el Certificado de Garantía de Calidad incluido con el producto. Si uno de los dos controles no cumple las condiciones para una corrida válida, todas las reacciones deben volver a analizarse, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, verifique lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionalidad de los dispositivos usados
- Ejecución de la prueba correcta

11. Interpretación de las muestras

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Detección de		
SARS-CoV-2	ICR	Resultado
positivo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 detectable
negativo	positivo	Gen diana no detectable
negativo	negativo	No válido

El SARS-CoV-2 es detectable si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

El SARS-CoV-2 también es detectable si el ARN presenta señal de amplificación, pero no se puede ver ninguna señal de amplificación para el **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del **Internal Control RNA**.

El SARS-CoV-2 no es detectable si el ARN no presenta señal de amplificación, pero se puede ver una señal de amplificación del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control RNA**.

Una muestra no es válida si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción. La muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

El límite de detección del ensayo RIDA®GENE, utilizando LightCycler® 480II, es > 50 copias / reacción. Las muestras con un valor de CT de > 35 están dentro del límite de detección. Cabe señalar que el límite de detección de la RT-PCR depende de la matriz de la muestra, el termociclador y la extracción de ARN y puede variar en consecuencia. Por lo tanto, recomendamos que estas muestras se evalúen como no concluyentes, se examinen las curvas individuales en busca de sigmoidez y se solicite una muestra de seguimiento correspondiente teniendo en cuenta los síntomas clínicos. El personal debidamente capacitado es responsable de evaluar estas muestras.

12. Limitaciones del método

1. Este ensayo está previsto solo para muestras respiratorias humanas.
2. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
3. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados no evaluables.
4. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados negativos falsos con RIDA®GENE SARS-CoV-2.
5. Como ocurre con todos los ensayos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
6. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que el gen diana (gen E) está presente.

7. La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. No se han investigado los efectos de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, agentes quimioterapéuticos o inmunosupresores para prevenir la COVID-19 o para tratar la infección u otras sustancias interferentes.
8. Este ensayo debe realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP).
El usuario debe seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.

13. Características de rendimiento

13.1 Precisión

La precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 se determinó para los siguientes niveles de observación.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480II en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control por duplicado durante 10 días hábiles por diferentes operadores en condiciones reproducibles.

Precisión interlote: las pruebas de precisión intra e interensayo se llevan a cabo en tres lotes diferentes.

Los coeficientes de variación obtenidos para las mediciones respectivas con el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 en el LightCycler® 480II fueron inferiores al 3 %

13.2 Sensibilidad analítica

13.2.1 Límite de detección del dispositivo

Para determinar el límite de detección del dispositivo, se midieron 20 réplicas de una muestra de control (50 copias/reacción) con el LightCycler® 480II. Todas las réplicas fueron positivas.

Por lo tanto, el límite de detección del dispositivo es de 50 copias/reacción.

13.2.2 Límite de detección (LD 95 %)

El límite de detección del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 se determinó en un estudio externo utilizando el MagNaPure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit y el LightCycler® 480II. El LD 95 % determinado aquí para el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 es de 4,3 copias/ml.⁷

El límite de detección del procedimiento general depende de la matriz de la muestra, el termociclador y la extracción de ARN.

13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 es específico para el SARS-CoV-2 humano de un hisopo nasofaríngeo. La coincidencia de secuencias utilizando las bases de datos de nucleótidos existentes (Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI) mostró especificidad para el SARS-CoV-2 y ninguna homología significativa con otros organismos.

También se probaron varios organismos. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

Coronavirus humano 229E	-	Parainfluenza 1 (cepa C35)	-	Enterovirus (Tipo 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Coronavirus humano OC43	-	Parainfluenza 2 (cepa Greer)	-	VSR (cepa Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Coronavirus humano NL63	-	Parainfluenza 3	-	VSR (cepa 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, cepa CH19503)	-	Rinovirus (genogrupo A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Gripe A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovirus 7, humano (cepa Gomen)	-	Gripe A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 1, humano (cepa Adenoid 71)	-	Gripe B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Metaneumovirus humano	-	Virus de la gripe B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Sensibilidad analítica

La reactividad analítica del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 se demostró utilizando el ensayo de aptitud INSTAND e.V. RV 340059 (consulte la tabla 11).

Tabla 11: Reactividad analítica

Tabla 11: Reactividad analítica					
SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se examinaron los efectos de varias sustancias que podrían estar presentes en las muestras correspondientes debido al uso generalizado en infecciones respiratorias o la ocurrencia generalizada (consulte la tabla 12).

Tabla 12: Sustancias interferentes

Ingrediente activo/producto farmacéutico	Concentración
Etanol	5 % [v/v]
Clorhidrato de guanidina	5 % [p/v]
Azitromicina	84 mg/ml
Mucina	60 µg/ml
Xilometazolina/aerosol nasal ratiopharm®	10 % [v/v]
Dipropionato de beclometasona	10 % [v/v]
Paracetamol	10 mg/ml
Amoxicilina	1 mg/ml
Sangre humana	2 % [v/v]
Dihidrocodeína	10 % [v/v]









Las sustancias enumeradas en la tabla 12 no mostraron ningún efecto de interferencia en las concentraciones probadas.

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2020-05-15	Versión anterior
2020-06-17	Revisión general: 2. Resumen y descripción del ensayo 5. Instrucciones de almacenamiento 11. Interpretación de las muestras 13. Características de rendimiento
2020-07-27	Revisión general: 2. Resumen y descripción del ensayo

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)

RIDA[®]GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Application

Pour le diagnostic in vitro. Le test RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 qui sera exécuté sur le LightCycler[®] 480II, est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'ARN du coronavirus (SARS-CoV-2) dans des frottis de gorge et nasopharyngiens humains de personnes présentant des symptômes d'une infection respiratoire.

Le test RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 est conçu pour étayer le diagnostic différentiel d'infections par le SARS-CoV-2 chez les patients présentant des symptômes d'une infection respiratoire conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire. Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

L'utilisation de ce produit est réservée aux professionnels travaillant dans des laboratoires hospitaliers, des laboratoires de référence, des laboratoires privés ou des laboratoires d'état.

2. Résumé et explication du test

Fin décembre, dans la métropole chinoise de Wuhan, de nombreux cas de pneumonie de cause inconnue ont été observés¹. Début janvier, les autorités chinoises ont identifié un nouveau type de coronavirus (SARS-CoV-2) comme en étant la cause¹. La maladie provoquée par le SARS-CoV-2 est officiellement appelée COVID-19 (« maladie à coronavirus 2019 ») et peut être transmise d'une personne à l'autre².

3 925 815 cas ont été signalés dans le monde entier (en date du 10 mai 2020)³. En Allemagne, les premiers cas ont été confirmés fin janvier 2020⁴. En Allemagne, 169 575 cas ont été signalés (en date du 11 mai 2020)^{4,5}. L'OMS a déclaré qu'il s'agissait d'une urgence de santé publique de portée internationale le 31 janvier 2020^{1,5}.

Les directives originales de l'OMS recommandaient une stratégie à trois cibles.⁶ Lorsque cette ligne directrice a été préparée, les informations sur la séquence du SARS-CoV-2 étaient insuffisantes, de sorte que les plages de séquences publiées par l'OMS dans les régions des gènes cibles individuels étaient trop non spécifiques

pour permettre une détection fiable de l'ARN du SARS-CoV-2. Afin d'accroître la spécificité des tests pour le SARS-CoV-2, une stratégie à trois cibles a été poursuivie en conséquence. Le 17 janvier 2020, cette stratégie à trois cibles a été réduite à une stratégie à deux cibles car la troisième cible présentait une sensibilité insuffisante. Le 17 mars 2020, l'OMS a publié des directives provisoires pour le diagnostic des cas suspects de coronavirus (COVID-19), causé par le SARS-CoV-2, en ce qui concerne les exigences relatives aux tests de laboratoire de biologie moléculaire, qui stipulent: « Dans les régions où le virus de la COVID-19 est largement répandu, un algorithme plus simple pourrait être adopté pour lequel, par exemple, le dépistage par RT-PCR en temps réel d'une seule cible discriminatoire du SARS-CoV-2 (stratégie à cible unique) est considérée comme suffisante. »

En développant le test RT-PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2, R-Biopharm AG a suivi dès le départ la stratégie à cible unique. Notre objectif était d'établir une détection sensible et spécifique du SARS-CoV-2 avec un flux de travail optimisé, c'est-à-dire sans nécessité d'une autre confirmation. Cela était possible même à ce moment-là car un grand nombre de séquences du génome du nouveau coronavirus SARS CoV-2 étaient disponibles. Au cours des analyses du génome, nous avons pu identifier une région du gène E qui est hautement spécifique au SARS-CoV-2 et qui présente une sensibilité élevée à des fins de dépistage. Cette région est située à environ 200 paires de bases en aval de la région non spécifique du gène E du SARS-CoV-2 publiée par l'OMS. En détectant cette région spécifique du gène E, nous avons ainsi pu réduire la détection de l'ARN du SARS-CoV-2 à une seule cible.

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE SARS-CoV-2 est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'ARN du coronavirus (SARS-CoV-2) dans des frottis de gorge et nasopharyngiens humains de personnes présentant des symptômes d'une infection respiratoire.

La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape: la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé est transcrit en ADNc à l'aide d'une transcriptase inverse. Les fragments de gène spécifiques du SARS-CoV-2 (gène E) sont alors amplifiés avec la PCR en temps réel. Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées à une extrémité avec un extincteur et à l'autre extrémité avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE SARS-CoV-2 contient un Internal Control RNA (ICR) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou toute éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations.)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rouge
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brun
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 20 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 °C à 8 °C).

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE SARS-CoV-2 a été testé avec la combinaison de plateforme d'extraction et d'instrument de PCR en temps réel suivante:

Tableau 2a: Matériel nécessaire (vérifié)

Plateformes d'extraction	
Promega	Maxwell®RSC
Dispositifs de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler®480II

De plus, le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE SARS-CoV-2 est compatible avec les plateformes d'extraction et les dispositifs de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2b: Matériel nécessaire (compatible)

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Dispositifs de PCR en temps réel	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: En cas d'utilisation du Rotor-Gene Q (QIAGEN), utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml.

Si vous devez utiliser d'autres procédures d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm AG à l'adresse mdx@r-biopharm.de pour en vérifier la compatibilité.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) lors de l'utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

- Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à

des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

- Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption.
- Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ARN à partir d'échantillons respiratoires humains

Un kit d'extraction d'acides nucléiques disponible dans le commerce (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm AG]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell®RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ARN à partir d'échantillons respiratoires humains. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE SARS-CoV-2 comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control RNA** peut être utilisé uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pendant l'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon.

Il est recommandé de pipeter 1 µl de **Internal Control RNA** par réaction au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif.

Pour des informations supplémentaires sur le prélèvement, la conservation et le transport des échantillons, consulter les Lignes directrices provisoires de l'OMS, en date du 2 mars 2020 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableaux 3 et 4). Avant d'utiliser le **Reaction Mix**, décongeler les **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control**, et **Internal Control RNA**, les mélanger soigneusement et les centrifuger brièvement. Toujours refroidir les réactifs correctement pendant les étapes de travail (2 °C à 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

Tableau 4: Exemple de calcul et de production du mélange maître pour 10 réactions (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

Contrôle négatif: Pipeter 5 µl de **No Template Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme un contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme un contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pipeté au préalable.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pipeté au préalable.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon les réglages de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6 et 7).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de la RT-PCR en temps réel pour LightCycler® 480II et RIDA®CYCLER

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6: Profil universel de la RT-PCR en temps réel pour les appareils Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™ Dx

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque: le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Vert	-
	ICR	Jaune	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Régler le colorant de référence sur aucun.
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Vert	Les réglages de gain doivent être définis sur 5 (valeur par défaut d'usine) pour tous les canaux.
	ICR	Jaune	

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher les résultats corrects (voir tableau 8). Le contrôle positif **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque analyse de PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Tableau 8: Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes:

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	Non détectable

*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICR pour le contrôle positif.

Les contrôles positif et négatif sont valides lorsqu'ils satisfont les conditions indiquées dans le tableau. La plage de Ct pour le contrôle positif est indiquée dans le Certificat d'assurance qualité inclus avec le produit. Si l'un des deux contrôles ne satisfait pas les conditions pour valider une exécution, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnalité des dispositifs utilisés
- Réalisation correcte du test

11. Interprétation des échantillons

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Détection		
SARS-CoV-2	ICR	Résultat
positif	positif/négatif	SARS-CoV-2 détectable
négatif	positif	Gène cible non détectable
négatif	négatif	Non valide

Le SARS-CoV-2 peut être détecté si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Le SARS-CoV-2 peut également être détecté si l'ARN présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le Internal Control RNA. La détection du Internal Control RNA (ICR) n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control RNA.

Le SARS-CoV-2 ne peut pas être détecté si l'ARN ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le Internal Control RNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control RNA.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué à 1/10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

La limite de détection du test RIDA®GENE, à l'aide du LightCycler® 480II, est supérieure à 50 copies / réaction. Les échantillons avec une valeur CT supérieure à 35 sont dans la limite de détection. Il convient de noter que la limite de détection de la RT-PCR dépend de la matrice de l'échantillon, du cycleur et de l'extraction de l'ARN, et peut varier en conséquence. Nous recommandons donc d'évaluer ces échantillons comme non concluants, d'examiner les courbes individuelles pour la sigmoïdité et de demander un échantillon de suivi correspondant en tenant compte des symptômes cliniques. Le personnel dûment formé est responsable de l'évaluation de ces échantillons.

12. Limites de la méthode

1. Ce test est uniquement conçu pour des échantillons respiratoires humains.
2. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
3. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut empêcher l'évaluation des résultats.
4. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE SARS-CoV-2.
5. À l'instar de tous les tests *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
6. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que le gène cible (gène E) est présent.

7. La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. Les effets de vaccins, traitements antiviraux, antibiotiques, médicaments de chimiothérapie ou immunosuppresseurs visant à prévenir la COVID-19 ou à traiter l'infection ou d'autres substances interférentes n'ont pas été étudiés.
8. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). L'utilisateur doit suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.

13. Performances

13.1 Précision

La précision du test de PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2 a été déterminée pour les niveaux d'observation suivants.

Précision intra-essai Détermination de 5 échantillons de contrôle avec 20 réplicats chacun sur le LightCycler® 480II dans des conditions identiques.

Précision inter-essais: Détermination de 5 échantillons de contrôle en double pendant 10 jours ouvrables par différents opérateurs dans des conditions reproductibles.

Précision inter-essais: Les tests pour la précision intra-essai et inter-essais sont réalisés sur trois différents lots.

Les coefficients de variation obtenus pour les mesures correspondantes avec le test de PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2 sur le LightCycler® 480II étaient inférieurs à 3 %

13.2 Sensibilité analytique

13.2.1 Limite de détection du dispositif

Pour déterminer la limite de détection du dispositif, 20 réplicats d'un échantillon de contrôle (50 copies/réaction) ont été mesurés avec le LightCycler® 480II. Tous les réplicats ont été positifs.

La limite de détection du dispositif est donc de 50 copies/réaction.

13.2.2 Limite de détection (LdD 95 %)

La limite de détection du test de PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2 a été déterminée dans une étude externe utilisant le kit IMagNaPure 96 DNA and Viral NA Small Volume et le LightCycler® 480II. La LdD de 95 % déterminée ici pour le test de PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2 est de 4,3 copies/ml⁷.

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, du cycleur et de l'extraction de l'ARN.

13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel RIDA®GENE SARS-CoV-2 est spécifique pour le SARS-CoV-2 humain venant d'un frottis nasopharyngien. La correspondance de séquences en utilisant des bases de données de nucléotides (National Center for Biotechnology Information, NCBI) a montré la spécificité pour le SARS-CoV-2 et aucune homologie avec d'autres organismes.

Divers organismes ont également été testés. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été trouvée (voir tableau 10):

Tableau 10: Test de la réactivité croisée

Coronavirus humain 229E	-	Virus parainfluenza 1 (souche C35)	-	Entérovirus (Type 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Coronavirus humain OC43	-	Virus parainfluenza 2 (souche Greer)	-	VRS (souche Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Coronavirus humain NL63	-	Virus parainfluenza 3	-	VRS (souche 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Virus parainfluenza 4 (b, souche CH19503)	-	Rhinovirus (Génogroupe A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Grippe A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adénovirus 7, humain (souche Gomen)	-	Grippe A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adénovirus 1, humain (souche Adénoïde 71)	-	Virus de la grippe B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Metapneumovirus humain	-	Virus de la grippe B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Réactivité analytique

La réactivité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE SARS-CoV-2 a été démontrée en utilisant l'essai d'aptitude INSTAND e.V. RV 340059 (voir le tableau 11).

Tableau 11: Réactivité analytique

SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. Par conséquent, les effets de diverses substances qui pourraient être présentes dans les échantillons correspondants en raison d'une utilisation généralisée dans les infections respiratoires ou d'une occurrence généralisée ont été examinés (voir le tableau 12).

Tableau 12: Substances interférentes

Ingrédient actif/pharmaceutique	Concentration
Éthanol	5 % (v/v)
Chlorhydrate de guanidine	5 % (p/v)
Azithromycine	84 mg/ml
Mucine	60 µg/ml
Xylométazoline/spray nasal ratiopharm®	10 % (v/v)
Dipropionate de béclométazone	10 % (v/v)
Paracétamol	10 mg/ml
Amoxicilline	1 mg/ml
Sang humain	2 % (v/v)
Dihydrocodéine	10 % (v/v)









Les substances énumérées dans le tableau 12 n'ont montré aucun effet perturbateur aux concentrations testées.

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2020-05-15	Version précédente
2020-06-17	Révision générale: 2. Résumé et explication du test 5. Instructions de conservation des réactifs 11. Interprétation des échantillons 13. Performances
2020-07-27	Révision du Mode d'emploi espagnol 2. Résumé et explication du test

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication

Symboles spécifiques des tests

Sans objet

16. Bibliographie

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)

RIDA®GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica in vitro. Il test RIDA®GENE SARS-CoV-2, da eseguire sul LightCycler® 480II Roche, è un test di RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta dell'RNA del coronavirus (SARS-CoV-2) da tampone faringeo e rinofaringeo di pazienti con sintomi di infezione respiratoria.

Il test RIDA®GENE SARS-CoV-2 è concepito per supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da SARS-CoV-2 in pazienti con sintomi di infezione respiratoria in combinazione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale in laboratori ospedalieri, laboratori di riferimento, laboratori privati o pubblici.

2. Sintesi e spiegazione del test

Alla fine di dicembre, nella metropoli cinese di Wuhan si sono verificati numerosi casi di polmonite di eziologia sconosciuta.¹ All'inizio di gennaio, le autorità cinesi hanno individuato la causa in un nuovo tipo di coronavirus (SARS-CoV-2).¹ La malattia causata da SARS-CoV-2 è ufficialmente denominata COVID-19 ("Malattia da coronavirus 2019") ed è trasmissibile da persona a persona.²

In tutto il mondo sono stati segnalati 3.925.815 casi (al 10 maggio 2020).³ I primi casi in Germania sono stati confermati alla fine di gennaio 2020.⁴ In Germania sono stati segnalati 169.575 casi (all'11 maggio 2020).^{4,5} L'OMS ha dichiarato l'emergenza sanitaria internazionale il 31 gennaio 2020.^{1,5}

Le linee guida originali dell'OMS raccomandavano una strategia a triplo target.⁶ Al momento della stesura di questa linea guida, le informazioni sulla sequenza del SARS-CoV-2 erano insufficienti, quindi gli intervalli di sequenza nelle singole regioni del gene target pubblicati dall'OMS erano troppo poco specifici per consentire una rivelazione affidabile dell'RNA del SARS-CoV-2. Al fine di aumentare la specificità dei test per il SARS-CoV-2, è stata perseguita di conseguenza una strategia a triplo target. Il 17 gennaio 2020, questa strategia è stata ridotta a una strategia a doppio target, poiché il terzo aveva una sensibilità insufficiente.

Per quanto riguarda i requisiti dei test di biologia molecolare, il 17 marzo 2020 l'OMS ha pubblicato una guida provvisoria per la diagnosi dei casi sospetti di malattia da coronavirus (COVID-19) causata dal virus SARS-CoV-2, in cui si afferma: "Nelle aree geografiche in cui il virus COVID-19 è ampiamente diffuso, potrebbe essere adottato un algoritmo più semplice in cui, ad esempio, lo screening mediante RT-PCR real-time di un singolo target SARS-CoV-2 discriminatorio (strategia a target singolo) è considerato sufficiente."

Nello sviluppo del test di RT-PCR real time RIDA®GENE SARS-CoV-2, R-Biopharm AG ha adottato la strategia del target singolo fin dall'inizio. Il nostro obiettivo era definire una rivelazione sensibile e specifica del SARS-CoV-2 con un flusso di lavoro ottimizzato, ovvero senza bisogno di ulteriori conferme. È stato possibile adottare questa strategia anche in quel momento perché le sequenze del genoma del nuovo coronavirus SARS CoV-2 erano disponibili in numero elevato. Nel corso delle analisi del genoma, siamo stati in grado di identificare una regione all'interno del gene E che è altamente specifica del SARS-CoV-2 e che mostra un'alta sensibilità ai fini dello screening. Questa regione si trova a circa 200 coppie di basi a valle della regione non specifica del gene E del SARS-CoV-2 pubblicata dall'OMS. Nel rilevare questa specifica regione del gene E, siamo stati così in grado di ridurre la rivelazione dell'RNA del SARS-CoV-2 a un solo target.

3. Principio del test

Il test RIDA® GENE SARS-CoV-2 è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di RNA di coronavirus (SARS-CoV-2) da tamponi faringei e rinofaringei in pazienti con sintomi di infezione respiratoria.

La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase: la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR hanno luogo nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici per SARS-CoV-2 (gene E) vengono quindi amplificati mediante PCR real-time. Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la Taq-polimerasi separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE SARS-CoV-2 contiene un Internal Control RNA (ICR) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni.)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- Il congelamento/lo scongelamento ripetuto fino a 20 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (2 - 8 °C).

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il test PCR real-time multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 è stato verificato con le piattaforme di estrazione e dispositivi per PCR real-time seguenti:

Tabella 2a: Attrezzatura necessaria (verificata)

Piattaforme di estrazione	
Promega	Maxwell®RSC
Dispositivi per PCR real-time	
Roche	LightCycler®480II

Il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 è compatibile con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2b: Attrezzatura necessaria (compatibile)

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Dispositivi per PCR real-time	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Quando si utilizza Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Per utilizzare altre procedure di estrazione o dispositivi per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm AG all'indirizzo mdx@r-biopharm.de per verificarne la compatibilità.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, pellicola)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Avvertenze e misure precauzionali

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.
- Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.
- Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.
- Assicurarsi che l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazione crociata.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.
- Dopo la data di scadenza smaltire il kit.

- Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da campioni respiratori umani

Per la preparazione dell'RNA da campioni respiratori umani si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come ad esempio RIDA®Xtract [R-Biopharm AG]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell® RSC [Promega]). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA®GENE SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come solo controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA** per ogni campione.

L'**Internal Control RNA** deve essere aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR mix sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

Per ulteriori informazioni sulla raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni, consultare le linee guida ad interim dell'OMS, 2 marzo 2020

<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

L'aggiunta di un ulteriore 10 % di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima di utilizzare la **Reaction Mix**, scongelare la **Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e il **Internal Control RNA**, mescolare accuratamente e centrifugare brevemente. Raffreddare adeguatamente i reagenti durante le fasi di lavoro (2 - 8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICR come controllo di estrazione e di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

Tabella 4: Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per dieci (10) reazioni (ICR solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (cuvetta o piastra).

Controllo negativo: Pipettare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

Campioni: dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo positivo.

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nel dispositivo per PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo per PCR real-time universale

Tabella 5: Profilo RT-PCR real-time universale per LightCycler® 480II e RIDA®CYCLER

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo universale RT-PCR real-time per Mx3005P, ABI7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q e CFX96™ Dx

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Nota: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Dispositivo per PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Verde	-
	ICR	Giallo	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Impostare il colorante di riferimento su none (nessuno).
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su nessuno.
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Verde	Il guadagno deve essere impostato su 5 (impostazione di fabbrica) per tutti i canali.
	ICR	Giallo	

10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi del dispositivo per PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 8).

Il **Positive Control** arriva a una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni esecuzione di PCR.

Tabella 8: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	Non rivelabile

*1 Un valore Ct per l'ICR non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.

I controlli positivi e negativi sono validi quando soddisfano le condizioni specificate nella tabella. L'intervallo Ct per il controllo positivo è specificato nel Certificato di garanzia di qualità accluso al prodotto. Se uno dei due controlli non soddisfa le condizioni per un'esecuzione valida, è necessario analizzare nuovamente tutte le reazioni, compresi i controlli.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dei dispositivi utilizzati
- Correttezza della procedura di esecuzione del test

11. Interpretazione del campione

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tabella 9: Interpretazione del campione

Rivelazione di		
SARS-CoV-2	ICR	Risultato
Positivo	Positivo/ Negativo	SARS-CoV-2 rivelabile
Negativo	Positivo	Gene target non rivelabile
Negativo	Negativo	Non valido

SARS-CoV-2 è comprovabile se sia l'RNA del campione sia l'**Internal Control RNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

SARS-CoV-2 è comprovabile anche se l'RNA mostra un segnale di amplificazione, ma non è presente nessun segnale di amplificazione per l'**Internal Control RNA** nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l'**Internal Control RNA** (ICR), perché concentrazioni elevate di ampliconi possono far sì che il segnale dell'**Internal Control RNA** sia debole o assente.

SARS-CoV-2 non è comprovabile se l'RNA non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale per l'**Internal Control RNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control RNA** esclude l'inibizione della reazione PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR nel campione o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con acqua per PCR e nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

Il limite di rivelazione del test RIDA[®]GENE con LightCycler[®] 480II, è maggiore di 50 copie / reazione. I campioni con un valore CT > 35 rientrano nel limite di rivelazione. Ricordiamo che il limite di rivelazione della RT-PCR dipende dalla matrice del campione, dal ciclatore e dall'estrazione dell'RNA, e può variare di conseguenza. Pertanto raccomandiamo di valutare questi campioni come non conclusivi, di esaminare l'andamento sigmoide delle singole curve e di richiedere un campione di follow-up tenendo conto dei sintomi clinici. La valutazione di questi campioni deve essere demandata a personale adeguatamente addestrato.

12. Limiti del metodo

1. Questo test è destinato esclusivamente a campioni respiratori umani.
2. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
3. La presenza di inibitori della PCR può condurre a risultati non valutabili.
4. Mutazioni o polimorfismi nel sito di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare il test RIDA[®]GENE SARS-CoV-2 a dare risultati falsi negativi.
5. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD), possono essere rivelate, ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
6. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza del gene target (gene E).
7. La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Non sono stati studiati gli effetti di vaccini, terapie

antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori per prevenire il COVID-19 o per trattare l'infezione o altre sostanze interferenti.

8. Questo test deve essere eseguito nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio. Durante l'esecuzione del test, l'operatore deve seguire attentamente le istruzioni del produttore.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Precisione

La precisione del test PCR real-time RIDA®GENE SARS-CoV-2 è stata determinata per i seguenti livelli di osservazione.

Precisione intra-test: Determinazione di 5 campioni di controllo con 20 replicati ciascuno sul LightCycler® 480II in condizioni identiche.

Precisione inter-test: Determinazione di 5 campioni di controllo in duplicati nell'arco di 10 giorni lavorativi da parte di diversi operatori in condizioni riproducibili.

Precisione inter-lotto: I test per la precisione intra e inter-test sono eseguiti su tre lotti diversi.

I coefficienti di variazione ottenuti per le misurazioni con il test PCR real-time RIDA®GENE SARS-CoV-2 su LightCycler® 480II erano inferiori al 3 %.

13.2 Sensibilità analitica

13.2.1 Limite di rivelazione del dispositivo

Per determinare il limite di rivelazione del dispositivo, sono stati misurati 20 replicati di un campione di controllo (50 copie/reazione) con LightCycler® 480II. Tutte le repliche erano positive.

Il limite di rivelazione del dispositivo è quindi di 50 copie/reazione.

13.2.2 Limite di rivelazione (LoD 95 %)

Il limite di rivelazione del test PCR real-time RIDA®GENE SARS-CoV-2 è stato determinato in uno studio esterno utilizzando il kit MagNaPure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il LightCycler® 480II. Il LoD 95 % determinato per il test PCR real-time RIDA®GENE SARS-CoV-2 è di 4,3 copie/ml.⁷

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dal ciclatore e dall'estrazione dell'RNA.

13.3 Specificità analitica

Il test PCR real-time RIDA®GENE SARS-CoV-2 è specifico per il SARS-CoV-2 umano da tampone rinofaringeo. L'abbinamento di sequenze utilizzando database di nucleotidi esistenti (National Center for Biotechnology Information, NCBI) ha mostrato specificità per SARS-CoV-2 e nessuna significativa omologia con altri organismi.

Sono stati testati anche vari organismi. Non sono state riscontrate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 10):

Tabella 10: Test di reattività crociata

Coronavirus 229E umano	-	Parainfluenza 1 (ceppo C35)	-	Enterovirus (tipo 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Coronavirus OC43 umano	-	Parainfluenza 2 (ceppo Greer)	-	RSV (ceppo Long)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Coronavirus NL63 umano	-	Parainfluenza 3	-	RSV (ceppo 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, ceppo CH19503)	-	Rhinovirus (genograppo A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovirus 7, umano (ceppo Gomen)	-	Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 1, umano, (ceppo Adenoid 71)	-	Influenza B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Metapneumovirus umano	-	Virus dell'influenza B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Reattività analitica

La reattività analitica del test PCR real-time multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 è stata dimostrata utilizzando il proficiency test (PT) INSTAND e.V. RV 340059 (vedere la Tabella 11).

Tabella 11: Reattività analitica

SARS-CoV-2 RV 340059					
SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Pertanto, sono stati esaminati gli effetti di varie sostanze che potrebbero essere presenti nei campioni in quanto spesso utilizzate nelle infezioni respiratorie o comunque ampiamente diffuse (vedere Tabella 12).

Tabella 12: Sostanze interferenti

Farmaco / Ingrediente attivo	Concentrazione
Etanolo	5 % [v/v]
Guanidina cloridrato	5 % [p/v]
Azitromicina	84 mg/ml
Mucina	60 µg/ml
Xilometazolina / spray nasale ratiopharm®	10 % [v/v]
Beclometasone dipropionato	10 % [v/v]
Paracetamolo	10 mg/ml
Amoxicillina	1 mg/ml
Sangue umano	2 % [v/v]
Diidrocodaina	10 % [v/v]









Le sostanze elencate nella Tabella 12 non hanno mostrato alcun effetto interferente alle concentrazioni testate.

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2020-05-15	Versione precedente
2020-06-17	Revisione generale: 2. Sintesi e spiegazione del test 5. Istruzioni di conservazione 11. Interpretazione del campione 13 Prestazioni e caratteristiche
2020-07-27	Revisione delle Istruzioni per l'uso in spagnolo 2. Sintesi e spiegazione del test

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione

Simboli specifici del test

Non pertinente

16. Bibliografia

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)

RIDA®GENE SARS-CoV-2

REF PG6815

1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico in-vitro. O teste RIDA®GENE SARS-CoV-2, que será realizado no Roche LightCycler® 480II, é um RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção qualitativa direta de RNA do coronavírus (SARS-CoV-2) na garganta humana e swabs nasofaríngeas de pessoas com sintomas de infecção respiratória. O teste RIDA®GENE SARS-CoV-2 foi desenvolvido para apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por SARS-CoV-2 em pacientes com sintomas de infecção do trato respiratório em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais. Resultados negativos não excluem a infecção por SARS-CoV-2 e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso por profissionais em laboratórios hospitalares, laboratórios de referência, laboratórios particulares ou laboratórios governamentais.

2. Sumário e explicação do teste

No final de dezembro, na metrópole chinesa de Wuhan, ocorreram vários casos de pneumonia de causa desconhecida.¹ No início de janeiro, as autoridades chinesas identificaram um novo tipo de vírus corona (SARS-CoV-2) como a causa.¹ A doença causada pelo SARS-CoV-2 é oficialmente denominada COVID-19 (“doença do vírus da corona 2019”) e é transmissível de pessoa para pessoa.²

Em todo o mundo, foram registrados 3.925.815 casos (em 10 de maio de 2020).³ Os casos iniciais na Alemanha foram confirmados no final de janeiro de 2020.⁴ Na Alemanha, foram relatados 169.575 casos (em 11 de maio de 2020).^{4,5} A OMS declarou uma emergência internacional de saúde em 31 de janeiro de 2020.^{1,5}

As diretrizes originais da OMS recomendavam uma estratégia de três alvos.⁶ Quando essa diretriz foi elaborada, havia informações insuficientes de sequências do SARS-CoV-2, de modo que os intervalos de sequências publicados pela OMS nas regiões gênicas alvo individuais eram muito pouco específicos para a detecção confiável do RNA do SARS-CoV-2. Para poder aumentar a especificidade dos testes de SARS-CoV-2, foi adotada uma estratégia de três alvos de forma correspondente. Em 17 de janeiro de 2020, essa estratégia de três alvos foi reduzida para uma estratégia de dois alvos, porque a sensibilidade apresentada pelo terceiro alvo era insuficiente.

Em 17 de março de 2020, a OMS emitiu uma diretriz provisória para o diagnóstico de casos suspeitos de doença por coronavírus (COVID-19), causada por SARS-CoV-2, no que diz respeito aos requisitos para testes laboratoriais de biologia molecular, que afirma: "Nas áreas em que o vírus da COVID-19 esteja amplamente disseminado, pode ser adotado um algoritmo mais simples no qual, por exemplo, uma triagem por RT-PCR em tempo real de um único alvo discriminatório de SARS-CoV-2 (estratégia de alvo único) é considerada suficiente."

Ao desenvolver o ensaio de RT-PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2, a R-Biopharm AG seguiu a estratégia de alvo único desde o início. Nosso objetivo era estabelecer a detecção sensível e específica do SARS-CoV-2 com um fluxo de trabalho otimizado, ou seja, sem que houvesse necessidade de confirmações adicionais. Isto foi possível nesse momento inclusive porque havia um grande número de sequências de genoma do novo SARS CoV-2 de coronavírus disponível. No decurso das análises do genoma, fomos capazes de identificar uma região dentro do gene E que é altamente específica para SARS-CoV-2 e possui alta sensibilidade para fins de triagem. Essa região está localizada a aproximadamente 200 pares de bases a jusante da região não específica do gene E do SARS-CoV-2 publicada pela OMS. Detectando essa região específica do gene E, fomos capazes de reduzir a detecção do RNA da SARS-CoV-2 para apenas um alvo.

3. Princípio do teste

O RIDA®GENE SARS-CoV-2 é um RT-PCR multiplexado em tempo real para a detecção qualitativa direta de RNA de coronavírus (SARS-CoV-2) da garganta humana e zaragatoas nasofaríngeas de pessoas com sintomas de infecção do trato respiratório.

A detecção é feita em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa: transcrição reversa (RT) e PCR subsequente ocorrem em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado é transcrito para o cDNA com a ajuda de uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos para SARS-CoV-2 (gene E) são então amplificados usando PCR em tempo real. As sequências alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são marcadas em uma extremidade com um extintor e um corante repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a Taq-Polymerase separa o repórter do extintor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE SARS-CoV-2 contém Internal Control RNA (ICR) para ser capaz de controlar o preparo da amostra e/ou qualquer potencial inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarelo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	vermelho
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	castanho
N	No Template Control	1x	450 µl	branco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instruções de armazenamento

- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C e 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 20 vezes não afeta a propriedade do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 °C - 8 °C).

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 foi verificado com a seguinte plataforma de extração e combinação de dispositivos de PCR em tempo real:

Tabela 2a: Equipamento necessário (verificado)

Plataformas de extração	
Promega	Maxwell®RSC
Dispositivos PCR em tempo real	
Roche	LightCycler®480II

Além disso, o teste de RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e dispositivos de PCR em tempo real:

Tabela 2b: Equipamento necessário (compatível)

Plataformas de extração	
R-Biopharm AG	RIDA®Xtract
Roche	MagNA Pure 96 ⁷
Dispositivos PCR em tempo real	
R-Biopharm AG	RIDA®CYCLER
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Indicação: Ao usar com o Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilize apenas tubos de 0,1 ml.

Se tiver que usar outros procedimentos de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm AG para verificar a compatibilidade em mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) ao usar o LightCycler® 480II
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, lâminas)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Vortexer
- Pipetas (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1.000 µl)
- Pontas de pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (livre de nuclease)

7. Medidas preventivas

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- Sempre cumpra estritamente as instruções de usuário para a realização desse teste.
- Não despeje amostras ou reagentes usando sua boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.
- Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.
- Garanta que a extração, a preparação da PCR e a PCR sejam realizadas em salas diferentes, a fim de evitar contaminações cruzadas.

- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Descarte o kit de teste assim que o prazo de validade expirar.
- Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) em www.r-biopharm.com.

8. Coleta e armazenamento de amostras

8.1 Preparação de RNA a partir de amostras respiratórias humanas

Um kit de extração de ácido nucleico disponível no mercado (por exemplo, RIDA®Xtract (R-Biopharm AG)) ou sistema de extração de ácido nucleico (por exemplo, Maxwell®RSC (Promega)) é recomendado para a preparação de RNA a partir de amostras respiratórias humanas. As instruções do fabricante devem ser observadas.

O teste RIDA®GENE SARS-CoV-2 contém um **Internal Control RNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4)

Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, durante o procedimento de extração, devem ser usados 20 µl do **Internal Control RNA** para cada amostra. O **Internal Control RNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Recomendamos adicionar 1 µl para cada reação do **Internal Control RNA** à mistura de PCR do controle negativo e do controle positivo.

Para obter mais informações sobre a coleta, armazenamento e transporte de amostras, consulte as orientações provisórias da OMS de 2 de março de 2020 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.⁶

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendável adicionar um volume adicional de 10 % à mistura principal para equilibrar a perda de pipeta (consulte a Tabela 3, Tabela 4). Antes de usar a **Reaction Mix**, descongele a **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control**, e **Internal Control RNA**, misture bem e centrifugue por um curto período de tempo. Sempre resfrie os reagentes adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C - 8 °C).

Tabela 3: Exemplo de cálculo e preparação da mistura principal para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

Tabela 4: Exemplo do cálculo e produção da mistura principal para dez (10) reações (ICR apenas como controle de inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (frasco/placa).

Controle negativo: Adicione 5 µl de **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle negativo.

Amostras: Adicione 5 µl de eluato à mistura principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl de **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle positivo.

Selar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o dispositivo de PCR em tempo real. Inicie a PCR de acordo com a configuração do instrumento de PCR (consulte a Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Tabela 5: Perfil de RT-PCR universal em tempo real para LightCycler® 480II e RIDA®CYCLER

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Tabela 6: Perfil de RT-PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, e CFX96™ Dx

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo

Indicação: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Indicação: O perfil de PCR em tempo real universal também pode ser utilizado em testes de DNA se houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e PCR em tempo real de RIDA®GENE RNA em uma execução.

9.4 Configuração do canal de detecção

Tabela 7: Seleção dos canais de detecção adequados

Dispositivo de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
R-Biopharm AG RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	Verde	-
	ICR	Amarelo	
Roche LightCycler® 480II	SARS-CoV-2	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
Agilent Technologies Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	Defina o corante de referência como nenhum.
	ICR	HEX	
ABI 7500 Fast Dx	SARS-CoV-2	FAM	Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.
	ICR	VIC	
Bio-Rad CFX96™ Dx	SARS-CoV-2	FAM	-
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas como 5 (padrão de fábrica) para todos os canais.
	ICR	Amarelo	

10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do respectivo dispositivo de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 8). O **Positive Control** vem em uma concentração de 10^3 cópias/ μ l. É usado em uma quantidade total de 5×10^3 cópias em cada execução de PCR.

Tabela 8: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	Não detectável

*1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.

Os controles positivo e negativo são válidos quando atendem às condições especificadas na tabela. A faixa de Ct para o controle positivo é especificada no Certificado de Garantia da Qualidade incluído no produto. Se um dos dois controles não atender às condições para uma execução válida, todas as reações precisarão ser analisadas novamente, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem obtidos, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade dos dispositivos utilizados
- Realização correta do teste

11. Interpretação das amostras

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9: Interpretação das amostras

Detecção de		
SARS-CoV-2	ICR	Resultado
positivo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 detectável
negativo	positivo	Gene-alvo não detectável
negativo	negativo	Inválido

O SARS-CoV-2 é detectado se a amostra RNA e o **Internal Control RNA** apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

O SARS-CoV-2 também é detectável se o RNA mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o Internal Control RNA no sistema de detecção. A detecção do Internal Control RNA não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do Internal Control RNA.

O SARS-CoV-2 não é detectável se o RNA não mostrar sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação puder ser visto para o Internal Control RNA no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do Internal Control RNA.

Uma amostra é inválida se o RNA da amostra e o Internal Control RNA não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Existem inibidores de PCR na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração. A amostra extraída deve ser diluída de 1:10 com água de PCR e re-amplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

O limite de detecção do ensaio RIDA®GENE usando o LightCycler® 480II é de >50 cópias / reação. Amostras com um valor de CT >35 estão dentro do limite de detecção. É necessário observar que o limite de detecção do RT-PCR depende da matriz da amostra, do ciclador e da extração do RNA, podendo variar de modo correspondente. Portanto, recomendamos que essas amostras sejam avaliadas como inconclusivas, examinar o quanto as curvas individuais podem ser sigmóides e solicitar uma amostra de acompanhamento correspondente levando em consideração os sintomas clínicos. A avaliação dessas amostras cabe a uma equipe devidamente treinada.

12. Limitações do método

1. Este teste é destinado apenas a amostras respiratórias humanas.
2. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado de amostras ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
3. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados não avaliáveis.
4. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o RIDA®GENE SARS-CoV-2.
5. Como em todos os testes *in vitro* baseados em PCR, podem ser detectadas concentrações extremamente baixas das sequências alvo abaixo do limite de detecção (LoD). Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
6. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que o gene alvo (gene E) está presente.
7. A presença de inibidores de RT-PCR e substâncias interferentes pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos. Os efeitos de vacinas, terapêuticas

antivirais, antibióticos, quimioterapêuticos ou imunossupressores na prevenção de COVID-19 ou no tratamento da infecção ou de outras substâncias interferentes não foram investigados.

8. Este ensaio deve ser realizado de acordo com as BPL (Boas Práticas de Laboratório).

O usuário deve seguir atentamente as instruções do fabricante ao realizar o teste.

13. Características de desempenho

13.1 Precisão

A precisão do teste de PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 foi determinada para os seguintes níveis de observação.

Precisão intraensaio: Determinação de 5 amostras de controle com 20 réplicas de cada no LightCycler® 480II sob condições idênticas.

Precisão interensaio: Determinação de 5 amostras de controle em duplicatas por 10 dias úteis por diferentes operadores em condições reprodutíveis.

Precisão inter-lote: Os testes de precisão intra e interensaios são realizados em três lotes diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos para as respectivas medições com o teste de PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 no LightCycler® 480II estavam abaixo de 3 %.

13.2 Sensibilidade analítica

13.2.1 Limite de detecção do dispositivo

Para determinar o limite de detecção do dispositivo, 20 repetições de uma amostra de controle (50 cópias/reação) foram medidos com o LightCycler® 480II. Todas as réplicas foram positivas.

O limite de detecção do dispositivo é, portanto, 50 cópias/reação.

13.2.2 Limite de detecção (LoD 95 %)

O limite de detecção do teste de PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 foi determinado em um estudo externo, utilizando o MagNaPure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit, além do LightCycler® 480II. O LoD 95 % determinado aqui para o teste de PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 é de 4,3 cópias/ml.⁷

O limite de detecção do procedimento geral depende da matriz da amostra, do cicladador e da extração do RNA.

13.3 Especificidade analítica

O teste de PCR em tempo real RIDA®GENE SARS-CoV-2 é específico para o SARS-CoV-2 humano de zangaratoa nasofaríngea. A correspondência de sequência usando bancos de dados de nucleotídeos existentes (National Center for

Biotechnology Information, NCBI) mostrou especificidade para SARS-CoV-2 e nenhuma homologia significativa com outros organismos. Vários organismos também foram testados. Não foram encontradas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 10):

Tabela 10: Testes de reatividade cruzada

Coronavírus humano 229E	-	Parainfluenza 1 (estirpe C35)	-	Enterovírus (Tipo 71)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Coronavírus humano OC43	-	Parainfluenza 2 (estirpe Greer)	-	RSV (estirpe longa)	-	<i>Bordetella pertussis</i>	-
Coronavírus humano NL63	-	Parainfluenza 3	-	RSV (estirpe 9320)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
SARS	-	Parainfluenza 4 (b, estirpe CH19503)	-	Rinovírus (genogrupo A)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-
MERS	-	Influenza A H1N1 Brisbane/59/07	-	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i>	-
Adenovírus 7, humano (estirpe Gomen)	-	Influenza A H3N2 Texas/50/12	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovírus 1, humano (estirpe adenoide 71)	-	Influenza B/Washington/02/2019	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Metapneumovírus humano	-	Influenza Virus B/Colorado/6/2017	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-

13.4 Reatividade analítica

A reatividade analítica do RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE SARS-CoV-2 foi demonstrada usando o teste de proficiência INSTAND e.V. RV 340059 (consulte a Tabela 11).

Tabela 11: Reatividade analítica

SARS-CoV-2 RV 340059	+				

13.5 Substâncias interferentes

A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, foram examinados os efeitos de várias substâncias que poderiam estar presentes nas amostras correspondentes devido ao uso generalizado em infecções respiratórias ou a ocorrência generalizada (ver Tabela 12).

Tabela 12: Substâncias interferentes

Ingrediente ativo/farmacêutico	Concentração
Etanol	5 % [v/v]
Cloridrato de guanidina	5 % (p/v)
Azitromicina	84 mg/ml
Mucina	60 µg/ml
Xilometazolina/ spray nasal ratiopharm®	10 % [v/v]
Dipropionato de beclometasona	10 % [v/v]
Paracetamol	10 mg/ml
Amoxicilina	1 mg/ml
Sangue humano	2 % [v/v]
Dihidrocodeína	10 % [v/v]









As substâncias listadas na Tabela 12 mostraram efeito não interferente nas concentrações testadas.

14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2020-05-15	Versão anterior
2020-06-17	Revisão geral: 2. Sumário e explicação do teste 5. Instruções de armazenamento 11. Interpretação das amostras 13 Características de desempenho
2020-07-27	Revisão do Instruções de uso espanhol 2. Sumário e explicação do teste

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação

Símbolos específicos do teste

Não aplicável

16. Referências

1. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 24.01.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 11.05.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 11.05.2020
5. <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Ausbrueche/respiratorisch/Pneumonien-China.html>. Zugriff am 03.02.2020
6. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Zugriff am 11.05.2020
7. van Kasteren, Puck B., et al. "Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19." bioRxiv (2020)