

RIDA® GENE Flu & SARS-CoV-2

REF PG6825



1. Zweckbestimmung

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

Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Flu A/Flu B und 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 Flu A/Flu B oder 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 2019 traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.¹ Anfang Januar 2020 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 Da es sich um einen neuen Erreger handelt kam es rasch von der Entwicklung einer Epidemie zu einer Pandemie.

Weltweit wurden bereits 105.805.951 Fälle gemeldet (Stand: 09.02.2021).³ Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden. Deutschlandweit wurden bereits 2.291.924 Fälle gemeldet (Stand: 09.02.2021).⁴ Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.¹

SARS-CoV-2 & Influenza-Viren weisen einige Gemeinsamkeiten auf. So ist bei beiden Erregern der Hauptübertragungsweg die respiratorische Aufnahme virushaltiger Flüssigkeitspartikel, die beim Atmen, Husten, Sprechen und Niesen entstehen.^{5,6} Die Symptome im frühen Stadium sind typisch für virologische Atemwegserreger. Zu den häufigsten erfassten Symptomen zählen bei beiden Erregern Fieber, Husten & Schnupfen. Da die Krankheitsverläufe bei SARS-CoV-2 in ihrer Symptomatik und Schwere stark variieren (symptomlos bis zu schwerer Pneumonie mit Lungenversagen und Tod) ist eine Differenzierung von SARS-CoV-2 & Influenza Viren für die weitere Therapie wichtig.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE Flu & SARS-CoV-2 ist ein multiplex real-time RT-PCR Test zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung der Flu A/Flu B und der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanen Nasen-/Rachenabstrichen. 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 Genfragmente für Influenza A (M-Gen), Influenza B (NP1-Gen) und SARS-CoV-2 (E-Gen; RdRp-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 Flu & 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 200 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	4x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	rot
R	Internal Control RNA	4x	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 Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR Test wurde mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Gerät Kombination verifiziert:

Tab.2a: Benötigtes Zubehör (verifiziert)

Extraktionsplattform	
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Gerät	
Roche	LightCycler® 480II

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

Tab. 2b: Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q
qTOWER ³	Analytik Jena
PCR Setup	
CyBio FeliX	Analytik Jena

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 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

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von 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) auf der R-Biopharm Homepage.

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)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Flu & 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.

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 (ausgenommen Enzyme Mix) 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® Serie 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 ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, CFX96™ Dx und qTOWER³

<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 RIDA®CYCLER	Influenza A/B	Green	-
	ICR	Yellow	
	SARS-CoV-2 E-Gen	Orange	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	Red	
Roche LightCycler® 480II	Influenza A/B	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
	SARS-CoV-2 E-Gen	533/610	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Influenza A/B	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 E-Gen	ROX	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Influenza A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 E-Gen	ROX	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	Influenza A/B	Green	Die Gain- Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	SARS-CoV-2 E-Gen	Orange	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	Red	
qTOWER³	Influenza A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 E-Gen	ROX	
	SARS-CoV-2 RdRp-Gen	Cy5	

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

Die Positivkontrolle setzt sich aus synthetischen RNA Fragmente zusammen und deckt mindestens ein Nachweissystem des entsprechenden Nachweiskanals ab. Demnach werden nicht zwangsläufig alle verwendeten Nachweissysteme mit einer Positivkontrolle abgedeckt. Für eine zusätzliche Qualitätskontrolle empfehlen wir daher, in regelmäßigen Abständen externen Kontrollen beziehungsweise vorbestimmte positiven Patientenproben mitzuführen.

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			ICR	Ergebnis
E-Gen (SARS-CoV-2)	RdRp-Gen (SARS-CoV-2)	M-Gen / NP1-Gen (Influenza A/B)		
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	Influenza A/B nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 und Influenza A/B nachweisbar
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	SARS-CoV-2 nachweisbar*
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

* schwache Kreuzreaktivität zu SARS-CoV-1 möglich

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

Bei dem hier detektierten E-Gen Abschnitt handelt es sich um ein SARS-CoV-2 spezifisches Fragment. Der detektierte RdRp-Gen Abschnitt zeigt beim Blast-Abgleich geringe Übereinstimmungen mit dem entsprechenden SARS-CoV-1 Sequenzabschnitt. Eine Amplifikation ist hier nicht 100% ausgeschlossen.

Die Sensitivität dieser beiden Fragmente bei SARS-CoV-2 Proben im LoD Bereich kann sich geringfügig unterscheiden was dazu führen kann, dass im LoD Bereich nur eines der beiden Gene als positiv zu bewerten ist.

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

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen

ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control RNA** ausgeschlossen werden.

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

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 Cyclus 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 Nasen-/Rachenabstriche geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. 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.
5. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene für Influenza A (M-Gen), Influenza B (NP1-Gen) und SARS-CoV-2 (E-Gen; RdRp-Gen) vorhanden sind.
6. 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.
7. Ab einer getesteten Konzentration von 3,0 % zeigt Dihydrocodein einen inhibitorischen Effekt auf den Nachweis von FluA/B.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE Flu & 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 Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR Test auf dem LightCycler® 480II lagen unter 2,5 %.

13.2 Analytische Sensitivität

13.2.1 Gerätenachweisgrenze

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

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

13.3 Analytische Spezifität

Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR Test ist spezifisch für humanes SARS-CoV-2 und Flu A/Flu B aus Nasen-/Rachenabstrichen.

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

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i> strain 5377	-	Adenovirus 1, Human, strain Adenoid 71	-	Adenovirus 7, Human, strain Gomen	-	<i>Bordetella parapertussis</i> strain 12822	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
Echovirus 11	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Enterovirus Typ 71, strain 2003 Isolate	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Human Coronavirus 229E	-	Human Coronavirus OC43	-
Human Coronavirus HKU1	-	Human Coronavirus NL63	-	Human Coxsackie virus A2, strain Fleetwood	-	Human Coxsackie virus B4	-
Human Cytomegalovirus	-	Human Metapneumovirus	-	Human Parainfluenza virus 1 strain C35	-	Human Parainfluenza virus 2 strain Greer	-
Human Parainfluenza virus serotype 3	-	Human Parainfluenza virus 4a strain M-25	-	Human Parainfluenza virus 4b strain CH19503	-	Human respiratory syncytial virus strain Long	-
Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	Human Rhinovirus genogroup A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Mumps virus genotype G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	-	<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-		-		-

13.4 Analytische Reaktivität

Die analytische Reaktivität der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Stämmen von Influenza A/B Viren und SARS-CoV-2 untersucht (s. Tab. 11).

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

Stamm	Influenza A/B	SARS-CoV-2 (E-Gen)	SARS-CoV-2 (RdRp-Gen)
SARS-CoV-2 (Isolate: USA-WA1/2020)	negativ	positiv	positiv
SARS-CoV-2 (Isolate:Italy-INMI1)	negativ	positiv	positiv
A/Brisbane/02/2018	positiv	negativ	negativ
A/Michigan/45/2015	positiv	negativ	negativ
A/California/7/2009	positiv	negativ	negativ
A/Brisbane/59/2007	positiv	negativ	negativ
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019	positiv	negativ	negativ
A/Kansas/14/2017	positiv	negativ	negativ
A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016	positiv	negativ	negativ
A/Hong Kong/2671/2019	positiv	negativ	negativ
A/Texas/50/2012	positiv	negativ	negativ
A/Perth/16/2009	positiv	negativ	negativ
A/Anhui/1/2013	positiv	negativ	negativ
B/Colorado/06/2017	positiv	negativ	negativ

B/Brisbane/60/2008	positiv	negativ	negativ
B/Washington/02/2019	positiv	negativ	negativ
B/Phuket/3073/2013	positiv	negativ	negativ

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) Für die Substanz Dihydrocodein wurden ein inhibitorischer Effekt ab einer getesteten Konzentration von 3,0 % beobachtet (siehe Grenzen der Methode). Für die anderen aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt (Tabelle 12):

Tab. 12: Liste der im Test verwendeten Substanzen und Konzentrationen










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]
Natriumchlorid	10 % [v/v]
Oseltamivirphosphat	25 mg/mL
Benzydaminhydrochlorid	10 % [v/v]

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-12-08	Vorversion
2021-02-16	2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 11. Interpretation der Ergebnisse 12. Grenzen der Methode 13.5 Interferierende Substanzen

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Zugriff am: 16.09.2020
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: 09.02.2021
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html/. Zugriff am: 09.02.2021
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Zugriff am: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Zugriff am: 16.09.2020