

## Gebrauchsanweisung

Ver. 1.6 (de), 01/2021

### ALLGEMEINE HINWEISE!

- Dieses Kit ist nur für *in vitro* diagnostische Zwecke geeignet.
- Lesen Sie bitte alle Anweisungen, die sich in dieser Gebrauchsanweisung, auf den Etiketten der Komponenten und auf der Außenverpackung befinden.
- SARS-CoV-2 ist ein gefährlicher Krankheitserreger, daher sollten alle relevanten Vorschriften und Empfehlungen für den Umgang mit dieser Art von Erreger befolgt werden.
- Ein positives Ergebnis, das mit dem Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Kit erhalten wird, bestimmt das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA in der Testprobe und ist nicht das einzige Kriterium für die Beurteilung der Infektiosität der getesteten Person. Es ist notwendig, andere Faktoren wie klinisches Erscheinungsbild, Ergebnisse anderen diagnostischen Tests und persönliche oder ärztliche Anamnese der getesteten Person zu berücksichtigen. In ähnlicher Weise schließt ein negatives Ergebnis eine Infektion der getesteten Person nicht aus, insbesondere beim Auftreten von Symptomen, die mit COVID-19 übereinstimmen. Die Ergebnisse sollten immer von geschultem medizinischem Personal interpretiert werden. Befolgen Sie bei Abweichungen zwischen dem Testergebnis und anderen klinisch relevanten Informationen das entsprechende Verfahren der Gesundheitsämter in Ihrer Gerichtsbarkeit.

### 1. Erklärungen und Abkürzungen

- Basislinie:** basale Hintergrund-Fluoreszenz oder sogenanntes Hintergrundgeräusch
- BSL:** biologische Sicherheitsstufe (entlehnt aus dem englischen biosafety level)
- COVID-19:** Infektionskrankheit, die von dem SARS-CoV-2 Virus hervorgerufen wird (entlehnt aus dem englischen CoronaVirus Disease 2019)
- Ct:** ein Zyklus, in dem die Fluoreszenz über den eingestellten Schwellenwert ansteigt.
- Cy3:** Cyanin 3 Fluoreszenzfarbstoff
- Cy5:** Cyanin 5 Fluoreszenzfarbstoff
- DNA:** Deoxyribonukleinsäure
- dUTP:** Deoxyuridtriphosphat
- FAM:** 6-Carboxyfluorescein Fluoreszenzfarbstoff
- Gen E:** Gen, das für das kleine Hüllprotein des SARS-CoV-2 Virus kodiert (entlehnt aus dem englischen envelope)
- Gen RdRP:** Gen, das für die RNA-abhängige RNA-Polymerase des SARS-CoV-2 Virus kodiert
- Gen RNase P:** Gen, das für menschliche Ribonuklease P kodiert
- Gen N:** Gen, das für Nukleokapsid-Phosphoprotein des SARS-CoV-2 Virus kodiert (entlehnt aus dem englischen nucleocapsid)
- LAMP:** Schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (entlehnt aus dem englischen Loop-mediated isothermal Amplification)
- LOD:** Detektionslimit (entlehnt aus dem englischen limit of detection)
- NTC:** Nicht-Template Kontrolle (Wasser) (entlehnt aus dem englischen Non Template Control)
- PC:** Positivkontrolle (entlehnt aus dem englischen Positive Control)
- qPCR:** quantitative Polymerase-Kettenreaktion (entlehnt aus dem englischen Quantitative Polymerase Chain Reaction)
- RNA:** Ribonukleinsäure

**ROX:** Carboxy-X-Rhodamin Fluoreszenzfarbstoff, verwendet als passiver Referenzfarbstoff

**RT-LAMP:** Reverse Transkriptase LAMP

**RT-qPCR:** Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

**SARS-CoV-2:** Schweres akutes Atemwegssyndrom-Coronavirus-Typ 2 (entlehnt aus dem englischen Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2)

**threshold:** Fluoreszenz Schwellenwert

**TTR:** Zeit-zur-Reaktion (entlehnt aus dem englischen "time to reaction"), LAMP Analogon des Ct-Wertes. Es ist die Zeit in Minuten, nach der die Fluoreszenz über den festgelegten Schwellenwert ansteigt.

### 2. Verwendungszweck

Das Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Diagnose-Kit ist ein qualitativer *in vitro* diagnostischer LAMP Test zum Nachweis des Vorhandenseins von SARS-CoV-2 Genmaterial in biologischen Proben, die durch Gurgeln aus den oberen Atemwegen entnommen werden. Das Diagnose-Kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G ist nur für die Verwendung in diagnostischem Labor oder in Räumlichkeiten mit geeigneten Sicherheitsstandards, Einrichtung und entsprechend geschultem Personal vorgesehen.

### 3. Testprinzip

Das Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Diagnose-Kit ist zum Nachweis von genomischer SARS-CoV-2 RNA aus biologischen Proben geeignet, die nur durch Gurgeln entnommen werden, d.h. ohne RNA Extraktion. Das Diagnose-Kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G ist ein isothermer LAMP Test, der sowohl zum Nachweis mittels Fluoreszenzänderung als auch Reaktionsfarbwechsel das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA entwickelt wurde. Der Test besteht nur aus einem Schritt, d.h. beinhaltet RT- und LAMP-Amplifikation in einer einzigen Reaktion (RT-LAMP). Darüber hinaus ist dieser Test so konzipiert, dass er nur mit minimal verarbeiteten Proben funktioniert, die durch Gurgeln entnommen werden, ohne dass eine vorherige RNA-Extraktion erforderlich ist. Die Gurgelproben müssen nur mit dem mitgelieferten Lysepuffer gemäß den Anweisungen erhitzt/inkubiert werden, bevor die Reaktion vorbereitet wird. Das Kit enthält einen Primersatz zum multiplexen Nachweis der E-, RdRP- und N-Gene von SARS-CoV-2 Virus. Dieses Primer Mix wurde speziell entwickelt und optimiert, damit Primer Wechselwirkungen nicht zu unspezifischen Amplifikationsprodukten und damit zu falsch positiven Ergebnissen führen, die für die LAMP-Methode relativ häufig sind. Gleichzeitig erhöht multiplexe LAMP-Detektion die Empfindlichkeit und verringert Unterschiede in der Detektionszeit. Der zweite Satz von Primern dient zum Nachweis des menschlichen RNase P-Gens, das als interne Kontrolle für RNA-Integrität, ordnungsgemäße Probeentnahme und Testdurchführung dient. Obwohl dieser Primersatz nicht zwischen Sequenzen der genomischen DNA und Messenger-RNA unterscheidet, zeigt er in der Praxis eine wesentlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber RNA-Substraten. Die vollständige genomische RNA des SARS-CoV-2-Virus, angereichert mit menschlicher RNA, bereitgestellt vom Biomedizinischen Zentrum der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, wird als interne positive Kontrolle im Kit eingeschlossen. Der im Kit eingeschlossene Master Mix enthält keinen fluoreszierenden Interkalationsfarbstoff zum Nachweis der Amplifikation mittels Fluoreszenzänderung. Wenn

jedoch ein solcher Farbstoff zugesetzt wird, kann die Reaktion in Echtzeit unter Verwendung einer qPCR-Thermozyklor beobachtet werden. Ein trockener Heizblock mit oder ohne Deckelwärmer, mit dem die Proben auf mindestens 95 °C erhitzt werden können, reicht jedoch aus, um die Reaktion durchzuführen. Darüber hinaus enthält das Kit ein intern entwickeltes und patentiertes kolorimetrisches Nachweissystem, das nicht auf den pH-Wert der Gurgelprobe anspricht. Dank diesem Nachweissystem ändert sich bei positiven Reaktionen die Farbe zuverlässig von magenta nach gelb, was mit bloßem Auge gut zu erkennen ist.

Ein Kit reicht für 400 Reaktionen, was bei anweisungsgemäßer Verwendung für 200 Gurgelproben ausreicht (200 Reaktionen für SARS-CoV-2 und 200 Reaktionen für RNase P). Vorbereitungsanweisungen finden Sie im Abschnitt 7.4. Zubereitung des Reaktionsgemisches. Der interne Kontrolltest für humane RNase P dient dazu, die Qualität der Probenentnahme und -verarbeitung zu überprüfen und das Vorhandensein von humaner RNA in der extrahierten Probe zu bestimmen, wodurch falsch negative Ergebnisse eliminiert werden.

### 4. Kit Zusammensetzung

- 1x Mischung lyophilisierter Primer für den SARS-CoV-2 Nachweis, markiert als SARS-CoV-2 Primer Mix (muss in 1200 µl PCR Wasser gelöst werden)
- 1x Mischung lyophilisierter Primer für RNase P Nachweis, markiert als RNase P Primer Mix (muss in 1200 µl PCR Wasser gelöst werden)
- 1x lyophilisierte PC SARS-CoV-2 BMC5 (muss in 120 µl PCR Wasser gelöst werden)
- 4x 1 ml LAMP 2x Master Mix
- 2x 1 ml LAMP 10x Lysepuffer
- 2x 5 ml PCR Wasser, Nuklease-frei
- 1x Gebrauchsanweisung

### 5. Lagerung und Haltbarkeit

#### ACHTUNG!

Do not use the kit after the expiry date, which is stated on the outer box.

#### ANMERKUNGEN!

- Tragen Sie geeignete Schutzkleidung, Handschuhe, Augen- und Gesichtsschutz.
- Waschen Sie Ihre Hände nach dem Umgang mit Proben und Reagenzien immer gründlich.

Alle Kit-Komponenten müssen bei -20 °C transportiert und gelagert werden. LAMP 2x Master Mix enthält lichtempfindliche Komponenten, die nach Möglichkeit vor Licht und Sonnenstrahlung geschützt werden sollten. Die Haltbarkeit des Kits beträgt maximal 12 Monate ab Herstellungsdatum. Das genaue Ablaufdatum des Kits ist auf der Außenverpackung angegeben. Das genaue Ablaufdatum der einzelnen Komponenten ist auf der Innenverpackung angegeben.

Das Kit und einzelne Komponenten sind für 400 Reaktionen bestimmt. Für Benutzer, die weniger Reaktionen innerhalb eines Laufs ausführen, empfehlen wir, dass Sie alle Kit-Komponenten gemäß den internen Verfahren und der Standardanzahl der Reaktionen pro Lauf aliquotieren. Das Aliquotieren der Kit-Komponenten minimiert

die Notwendigkeit, einzelne Röhrchen erneut zu öffnen, und minimiert somit das Risiko einer Kontamination der Kit-Komponenten. Das Aliquotieren der Kit-Komponenten verhindert auch das wiederholte Auftauen und Einfrieren der einzelnen Komponenten, was sonst zu einer verringerten Effizienz führen kann. Vor dem Aliquotieren müssen die einzelnen Komponenten des Kits vollständig aufgetaut werden. Das Auftauen erfolgt optimalerweise durch Inkubation im Kühlschrank (bei +4 °C) für ca. 2 Stunden. Unmittelbar vor dem Aliquotieren muss der Inhalt der Röhrchen gründlich, aber sorgfältig gemischt werden, damit er vollständig homogen ist. Bei Enzymen enthaltenden Röhrchen (LAMP 2x Master Mix) empfehlen wir das Mischen durch mehrmaliges Drehen des Röhrchens, Pulswirbeln oder kurzes Verwirbeln nicht länger als 5 Sekunden. Bei Enzymen enthaltenden Mischungen empfehlen wir vorsichtig und langsam pipettieren, da sonst die Viskosität des Puffers zu einem Pipettierfehler führen kann.

## 6. Verbrauchsmaterialien und Instrumente, die im Kit nicht eingeschlossen sind

- (für Probeninaktivierung) Trockener Heizblock, der Proben auf mindestens 95 °C erhitzen kann
- (für Amplifikation) Heizblock, der Proben auf mindestens 65 °C erhitzen kann – Diagnose-Kit **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** wurde auf folgenden Instrumenten getestet und verifiziert:
- Echtzeit PCR Zyklus: Agilent – Mx3005P® and AriaMx®, Thermo Fisher Scientific – QuantStudio™ 5, BioRad – CFX96™
- Heizblöcke: SensoQuest – SensoQuest Gradient Labcycler
- Trockenblock-Inkubatoren: Thermo Fisher Scientific – Produkte der Serie Digital Dry Baths und Produkte der Serie Fisherbrand™ Isotemp Digital Dry Baths/Block Heaters
- fluoreszierender Interkalationsfarbstoff (bei Verwendung der Fluoreszenzdetektion sehen Sie den Abschnitt 7.4 Zubereitung des Reaktionsgemisches)
- Vortexer
- kleine Tischzentrifuge
- Zentrifuge mit Rotor für Platten
- persönliche Schutzausrüstung: puderfreie Einweg-Laborhandschuhe, Schutzbrille, Schutzschild, FFP3-Atmungsgerät, Schutzkleidung
- nicht DNA/RNA-bindende Laborplastik: Reagenzgläser, PCR-Einzelgefäße, -Streifen, -Platten oder -Filme und andere Verbrauchsmaterialien, die mit der gewählten Methode zur Durchführung der Reaktion kompatibel sind; sterile Pipettenspitzen mit Filter
- autoklavierbare einstellbare Mikropipetten
- Bioabfallbehälter
- autoklavierbare Reagenzglasbehälter und Aufbewahrungsboxen
- PCR-Kühlregal

## 7. Arbeitsablauf

### ACHTUNG!

Die Arbeiten mit dem Kit müssen nur von dem qualifizierten Personal durchgeführt werden.

### ANMERKUNGEN!

- Arbeitsbereiche müssen so bereitgestellt werden, dass separate Räume (Zonen) für Isolierung von Nukleinsäuren, Zubereitung des Reaktionsgemisches und Detektion von Amplifikationsprodukten vorhanden sind. Amplifikationsprodukte dürfen niemals einen Raum (eine Zone) betreten, der für Nukleinsäureisolierung oder Zubereitung des Reaktionsgemisches vorgesehen ist.
- Erhalten Sie für folgende Arbeitsschritte

separate Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien aufrecht: Nukleinsäureisolierung, Zubereitung des Reaktionsgemisches und Nachweis von Amplifikationsprodukten.

- Verwenden Sie niemals dieselben Laborkittel, Handschuhe, Schutz- und Hilfsmittel in verschiedenen Räumen (Zonen).
- Behandeln Sie alle biologischen Gurgelproben immer als potenziell infektiöses Material. Vermeiden Sie direkten Kontakt mit biologischem Material. Verschütten Sie keine Proben, Reagenzien und Aerosole.
- Nach Verarbeitung der Gurgelproben wird empfohlen, den Heizblock so bald wie möglich anzuschalten, um eine mögliche Probendegradierung zu vermeiden.
- Befolgen Sie die beiliegende Gebrauchsanweisung.

Für die Durchführung des RT-LAMP Tests sind mindestens 2 verschiedene Heizquellen erforderlich:

- Heizquelle, die Proben auf 95 °C erhitzen kann – Trockenblock-Inkubator mit Blöcken, die für 0,5 ml und 0,2 ml PCR-Einzelgefäße / Streifen oder Platten geeignet sind. Diese Quelle sollte immer vorgewärmt sein und kann auch für den optionalen Reaktionsabbruchsschritt verwendet werden (sehen Sie den Abschnitt 7.6. Parameter der RT-LAMP Reaktion).
- Heizquelle, die Proben auf 65 °C erwärmen kann – Trockenblock-Inkubator oder PCR-Thermostyzykler, geeignet für 0,2 ml PCR-Einzelgefäße / Streifen oder Platten. Es können Reaktionsgefäße mit größerem Volumen (z.B. 0,5 ml) verwendet werden. Wir empfehlen jedoch, diese wegen möglicher Probleme mit der Wasserkondensation nicht ohne Erhitzen des Deckels zu verwenden.

## 7.1. Entnahme und Verarbeitung der Gurgelproben

### ACHTUNG!

Das Kit **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** ist nur zur Verwendung mit Proben vorgesehen, die durch Gurgeln entnommen werden. Die Nichtbeachtung der unten beschriebenen Anweisungen kann zu einer Verringerung der Empfindlichkeit und/oder Spezifität des RT-LAMP Tests führen.

### ANMERKUNGEN!

- Das unten beschriebene Gurgelverfahren ist nur eine Empfehlung und entspricht den Anweisungen, die den Patienten während der Probenentnahme für klinischen Validierung gegeben wurden.
- Es wird nicht empfohlen, vor der Probenentnahme mindestens eine Stunde lang zu essen, zu trinken, die Zähne zu putzen, den Mund auszuspülen, Kaugummi zu kauen oder zu rauchen.
- Die Verwendung von kommerziellen isotonischen Kochsalzlösungen wird empfohlen, aber nicht kommerzielle Lösungen vor Ort sind zulässig, solange das verwendete Wasser von Aqua pro injectione oder gleichwertig ist.

### Probenentnahme:

- Der Patient erhält einen Behälter (z. B. ein 50 ml Polypropylenröhrchen) mit 5 ml isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl Wasserlösung).
- Der Patient wird dann gebeten, die bereitgestellte Kochsalzlösung 10-mal für 5 Sekunden zu gurgeln, wobei darauf zu achten ist, dass die Lösung nicht verschluckt wird. Insgesamt dauert es ungefähr 1 Minute. Es ist nicht notwendig, die Mundhöhle mit der Lösung zwischen Gurgeln zu spülen.
- Der Patient wird dann gebeten, das Gurgeln langsam und vorsichtig in einen vorbereiteten Behälter (z. B.

einen, in dem die Kochsalzlösung bereitgestellt wurde) geben. Nach äußerer Desinfektion des Behälters ist die durch Gurgeln gewonnene Probe zur weiteren Verarbeitung bereit.

- Wenn die Inaktivierung nicht sofort durchgeführt wird, lagern Sie bitte frische Gurgelproben maximal eine Woche lang bei +4 °C.

### Probenverarbeitung:

- Mischen Sie die durch Gurgeln erworbene Probe vorsichtig, aber gut, um abgesetztes Material zu resuspendieren. Aggressives Verwirbeln kann zur Schaumbildung führen, was zu diesem Zeitpunkt ein erhebliches Risiko darstellt, da die Gurgelprobe noch nicht inaktiviert wurde.
- In einem Röhrchen mit dem Mindestvolumen von 200 µl (z. B. PCR oder 0,5 ml Röhrchen) mischen Sie bitte die Gurgelprobe mit dem mitgelieferten LAMP 10x Lysepuffer im folgenden Verhältnis: 90 µl Gurgelprobe + 10 µl LAMP 10x Lysepuffer
- Schließen Sie das Röhrchen und mischen Sie den Inhalt vorsichtig.
- Inkubieren Sie die Mischung für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Etwas längere Inkubationszeiten (bis zu 10 Minuten) wirken sich nicht negativ aus.
- Inkubieren Sie die Proben für 7 Minuten bei 95 °C. Dieser Schritt inaktiviert die Viruspartikel thermisch und setzt virale RNA in Lösung frei.
- Lassen Sie die Probe einige Sekunden abkühlen. Anschließend zentrifugieren Sie die Probe für etwa 1 Minute in einer Tischzentrifuge. Ausgefallene Proteine und anderes unlösliches Material bilden am Boden ein Pellet.
- Der erhaltene Überstand wird als Ausgangsmaterial für den RT-LAMP Test verwendet.
- Im Idealfall sollten inaktivierte Gurgelproben so bald wie möglich analysiert werden. Sie sind jedoch einen Tag bei -20 °C stabil. Für längere Zeiträume sollten die Proben mindestens bei -70 °C gelagert werden. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen und Einfrieren von Proben.

### ACHTUNG!

Tragen Sie während der Arbeit und in dem dafür vorgesehenen Bereich immer persönliche Schutzausrüstung. Gehen Sie vorsichtig mit allen Proben um und behandeln Sie sie als potenziell infektiöses Material.

### ANMERKUNGEN!

- Die Gurgelproben sind ausschließlich für diese Art der Analyse bestimmt.
- Befolgen Sie die Anweisungen zur Probenverarbeitung genau, um einen Abbau der Nukleinsäuren zu verhindern.
- Öffnen Sie nicht einzelne Proben gleichzeitig, um eine mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Vortexen und zentrifugieren Sie die Proben in einer Laminar Flow Box oder PCR Box, um eine Aerosolkontamination zu verhindern.
- Verwenden Sie Pipetten, die ausschließlich für die Probenhandhabung entwickelt wurden, und verwenden Sie Einwegfilterspitzen, die als steril und frei von DNA, RNA, DNAsen und RNAsen zertifiziert sind.

## 7.2. Vorbereitung des Arbeitsbereichs

### ACHTUNG!

Reinigen Sie vor Beginn des Protokolls zuerst den Arbeitsbereich und die angrenzenden Oberflächen mit 10% Natriumhypochloritlösung (Bleichmittel) und anschließend mit hochreinem Wasser, um restliches Hypochlorit zu entfernen.

Verwenden Sie nach Möglichkeit auch einen UV-Dekontaminationszyklus vor und nach einer gründlichen manuellen Dekontamination des Arbeitsbereichs.

### 7.3. Reagenzienvorbereitung

#### ACHTUNG!

Arbeiten Sie mit Reagenzien immer nur an einem dafür vorgesehenen Ort, z. B. in einer Laminar-Flow-Box.

Bereiten Sie die Reagenzien ausschließlich für eine Analyse vor.

Verwenden Sie Pipetten und Einwegfilterspitzen, die ausschließlich für die Reagenzienvorbereitung entwickelt wurden.

Die verwendeten Filterspitzen müssen frei von DNA, RNA, DNasen und RNasen sein.

#### ANMERKUNGEN!

- Verwenden Sie nur die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien und die vom Hersteller empfohlenen Reagenzien.
- Kombinieren Sie keine Reagenzien aus Kits von verschiedenen Herstellern.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht kombiniert oder gemischt werden.

Nehmen Sie die erforderlichen Kit-Komponenten aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie vollständig in einem Kühl-Regal oder im Kühlschrank auftauen (+4 °C). Sobald die Zutaten vollständig aufgetaut sind, mischen Sie ihren Inhalt gründlich, aber vorsichtig, bis er vollständig homogen ist. Bei Enzymen enthaltenden Röhrchen (LAMP 2x Master Mix) empfehlen wir das Mischen durch mehrmaliges Drehen des Röhrchens, Pulswirbeln oder kurzes Verwirbeln nicht länger als 5 Sekunden. Zentrifugieren Sie dann die Röhrchen kurz, um Tröpfchen aus dem Inneren der Kappe zu entfernen. Pipettieren Sie das Reaktionsgemisch vorsichtig und langsam, da die Viskosität des Puffers zu Pipettierfehlern führen kann. Primer Mischungen zum Nachweis von SARS-CoV-2 und humaner RNase P (SARS-CoV-2 Primer Mix, RNase P Primer Mix) und Positivkontrolle PC-SARS-CoV-2-BMC5 werden zur Erhöhung der Stabilität in lyophilisierter Form geliefert. Daher ist es bei der erstmaligen Verwendung des Kits erforderlich, die Primer- und Positivkontrollmischungen in dem für die PCR zu verwendendem Wasser aufzulösen. Da die Menge an Primern im SARS-CoV-2-Primer Mix sehr hoch ist, kann es länger als erwartet dauern, bis sich das gesamte Pellet aufgelöst hat.

#### ACHTUNG!

Die Pellets lyophilisierter Primer Mischungen können während des Transports freigesetzt werden, daher ist es notwendig, jedes Röhrchen kurz vor dem Öffnen zu zentrifugieren. Das Weglassen dieses Schritts kann zum Verlust von Oligonukleotiden aus dem Röhrchen führen, was zu geringeren Ausbeuten führen kann.

Geben Sie 1200 µl PCR-Wasser aus dem PCR-Wasserröhrchen in das mit SARS-CoV-2-Primer Mix gekennzeichnete Röhrchen (400 Reaktionen) und 1200 µl PCR-Wasser in das mit RNase P-Primer-Mix gekennzeichnete Röhrchen (400 Reaktionen). Dann geben Sie 120 µl PCR-Wasser in das Röhrchen, das die PC SARS-CoV-2 BMC5 Positivkontrolle enthält.

Vortexen Sie den Inhalt des Röhrchens gründlich und zentrifugieren Sie es kurz, um Tröpfchen aus dem Inneren der Kappe und die gesamte Flüssigkeit am Boden des Röhrchens zu entfernen.

Bereiten Sie das Reaktionsgemisch so bald wie möglich vor, nachdem Sie den Inhalt der einzelnen Komponenten des Kits gemischt haben. Falls erforderlich, mischen Sie den Inhalt des Röhrchens noch einmal kurz vor der Herstellung des Reaktionsgemisches.

Nach Gebrauch stellen Sie alle Komponenten des Kits wieder in den Gefrierschrank (bei -20 °C). Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Komponenten. Wenn eine Wiederverwendung innerhalb von weniger als 2 Stunden geplant ist, lagern Sie die Komponenten bei +4 °C.

### 7.4. Zubereitung des Reaktionsgemisches

#### ANMERKUNGEN!

- Das Reaktionsgemisch hat eine begrenzte Stabilität. Verwenden Sie es so bald wie möglich nach der Zubereitung. Wenn das Reaktionsgemisch nicht sofort verwendet wird, lagern Sie es im Kühlschrank bei +4 °C.
- Bei der Vorbereitung mehrerer Reaktionen wird es empfohlen, um mindestens 5% mehr Reaktionsgemisch herzustellen, um Pipettierfehler zu berücksichtigen (wir empfehlen 5% zusätzlich).

Diagnose-Kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G kann in zwei Modi verwendet werden:

- Kolorimetrische Detektion
- Fluoreszenzdetektion

Die kolorimetrische Detektion ist ein Standard. Falls gewünscht, kann die Fluoreszenzdetektion implementiert werden, indem in das Reaktionsgemisch ein LAMP-kompatibler interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zugegeben wird und ein kompatibler Heizblock oder ein RT-qPCR-System verwendet wird. Gemäß dem Abschnitt 9. Funktionsmerkmale des Kits kann die Verwendung der Fluoreszenzdetektion die Uneindeutigkeiten bei der Interpretation von Ergebnissen mit unschlüssigem Farbwechsel beseitigen. Wenn diese Art des Nachweises erforderlich ist, sehen Sie die Tabellen 2 und 4 zur Vorbereitung der Reaktion, andernfalls sehen Sie Tabellen 1 und 3.

#### ANMERKUNGEN!

- Reagenzien für Fluoreszenzdetektion sind nicht im Kit eingeschlossen.

- Wir empfehlen keine EvaGreen™ oder SYBR™ Green I Farbstoffe anzuwenden, um die RT-LAMP Reaktion in Echtzeit zu überwachen, da diese interkalierenden Farbstoffe wesentlich die LAMP Amplifikation verlangsamen und ihre Anwendung kann zu einer Hemmung bis zum Versagen der Reaktion führen.
- Die Konzentration des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes sollte vom Benutzer optimiert werden, um den Parametern des ausgewählten PCR-Nachweissystems zu entsprechen.

Interkalierende Farbstoffe, die bei internen Tests keine Verlangsamung der LAMP-Amplifikation gezeigt haben:

- Für einen optischen Kanal zum Nachweis eines FAM-Fluorophors:
  - » SYTO™ 9
  - » Anregungsmaximum: 485 nm
  - » Emissionsmaximum: 498 nm
  - » Empfohlener Konzentrationsbereich: 1-4 µM in der Endreaktion, 2 µM Ausgangskonzentration
- Für einen optischen Kanal zur Erkennung des Cy3-Fluorophors:
  - » SYTO™ 82
  - » Anregungsmaximum: 541 nm
  - » Emissionsmaximum: 560 nm
  - » Empfohlener Konzentrationsbereich: 0.1-1 µM in der Endreaktion, 0.5 µM Ausgangskonzentration
- Für einen optischen Kanal zur Erkennung des Cy5-Fluorophors:
  - » SYTO™ 59
  - » Anregungsmaximum: 622 nm
  - » Emissionsmaximum: 645 nm
  - » Empfohlener Konzentrationsbereich: 0.1-1 µM in der Endreaktion, 0.5 µM Ausgangskonzentration

Das empfohlene Gesamtvolumen einer Reaktion beträgt 20 µl. Zur Herstellung des Reaktionsgemisches müssen die einzelnen Komponenten des Kits in der folgenden Reihenfolge und im folgenden Verhältnis gemischt werden:

Tabelle 1. Zubereitung des Reaktionsgemisches - kolorimetrische Detektion

Kit Komponente	Komponentevolumen pro Reaktion	
	SARS-CoV-2	RNase P
PCR Wasser	4 µl	4 µl
LAMP 2x Master Mix	10 µl	10 µl
SARS-CoV-2 Primer Mix	3 µl	-
RNase P Primer Mix	-	3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>17 µl</b>	<b>17 µl</b>

Tabelle 2. Zubereitung des Reaktionsgemisches - Fluoreszenzdetektion

Kit Komponente	Komponentevolumen pro Reaktion	
	SARS-CoV-2	RNase P
PCR Wasser	3 µl	3 µl
20x Interkalierende fluoreszierende Farbstofflösung <sup>a</sup>	1 µl	1 µl
LAMP 2x Master Mix	10 µl	10 µl
SARS-CoV-2 Primer Mix	3 µl	-
RNase P Primer Mix	-	3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>17 µl</b>	<b>17 µl</b>

Tabelle 3. Zubereitung des Reaktionsgemisches – kolorimetrische Detektion

Anzahl der Reaktionen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	96
PCR Wasser	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl	24 µl	28 µl	32 µl	36 µl	40 µl	384 µl
LAMP 2x Master Mix	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl	960 µl
Primer Mix (SARS-CoV-2 oder RNase P)	3 µl	6 µl	9 µl	12 µl	15 µl	18 µl	21 µl	24 µl	27 µl	30 µl	288 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>17 µl</b>	<b>34 µl</b>	<b>51 µl</b>	<b>68 µl</b>	<b>85 µl</b>	<b>102 µl</b>	<b>119 µl</b>	<b>136 µl</b>	<b>153 µl</b>	<b>170 µl</b>	<b>1632 µl</b>

Tabelle 4. Zubereitung des Reaktionsgemisches – Fluoreszenzdetektion

Anzahl der Reaktionen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	96
PCR Wasser	3 µl	6 µl	9 µl	12 µl	15 µl	18 µl	21 µl	24 µl	27 µl	30 µl	288 µl
20x Interkalierende fluoreszierende Farbstofflösung*	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	6 µl	7 µl	8 µl	9 µl	10 µl	96 µl
LAMP 2x Master Mix	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl	960 µl
Primer Mix (SARS-CoV-2 or RNase P)	3 µl	6 µl	9 µl	12 µl	15 µl	18 µl	21 µl	24 µl	27 µl	30 µl	288 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>17 µl</b>	<b>34 µl</b>	<b>51 µl</b>	<b>68 µl</b>	<b>85 µl</b>	<b>102 µl</b>	<b>119 µl</b>	<b>136 µl</b>	<b>153 µl</b>	<b>170 µl</b>	<b>1632 µl</b>

\*Vom Bediener ausgewählter fluoreszierender Interkalationsfarbstoff – diese Lösung sollte das 20-fache der endgültigen Reaktionskonzentration des ausgewählten Farbstoffs enthalten.

## 7.5. Vorbereitung der Reaktion und Kontrollen

Zu den hergestellten 17 µl des Reaktionsgemisches werden 3 µl der durch Gurgeln entnommenen inaktivierten Probe gegeben. Das resultierende Gesamtreaktionsvolumen beträgt 20 µl.

### ANMERKUNGEN!

- Die Verwendung eines anderen Probenvolumens als empfohlen kann die Leistung des Kits beeinträchtigen.
- Wenn Sie zur Durchführung der Reaktionen einen Trockenblock-Inkubator verwenden, stellen Sie sicher, dass dieser auf eine Betriebstemperatur von 65 °C vorgewärmt ist.
- Der Trockenblock sollte spezifisch für die ausgewählten Reaktionsgefäße sein, um einen guten Kontakt zwischen den Gefäßen und dem Trockenblock zu gewährleisten.

Bereiten Sie die erforderliche Anzahl sauberer PCR-Röhrchen, -Streifen, -Platten oder anderer geeigneter Reaktionsgefäße vor und stellen Sie diese, falls verfügbar, in ein gekühltes Kühlregal. Mischen Sie das vorbereitete Reaktionsgemisch gründlich, aber vorsichtig, indem Sie das Röhrchen mehrmals umdrehen und nicht länger als 5 Sekunden pulsieren oder kurz verwirbeln. Zentrifugieren Sie es dann kurz, um Tröpfchen aus dem Inneren der Kappe zu entfernen. Pipettieren Sie 17 µl des hergestellten Reaktionsgemisches entsprechend der erforderlichen Anzahl von Reaktionen in die einzelnen Reaktionsgefäße. Bewegen Sie dann die Reaktionsgefäße mit dem pipettierten Reaktionsgemisch aus der sauberen Zone (vorzugsweise der laminaren Flow Box) in die Zone, die für die Handhabung von Positivkontrollen und Patientenproben (vorzugsweise PCR oder laminare Flow Box) reserviert ist. Geben sie anschließend 3 µl inaktivierte Gurgelprobe oder 3 µl Positivkontrolle (PC SARS-CoV-2 BMC5) oder 3 µl PCR-Wasser (NTC) in geeignete Reaktionsgefäße und verschließen Sie sie dicht entweder mit Deckel oder optischer Folie. Zentrifugieren Sie die Gefäße kurz, so dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden befindet, und legen Sie die Gefäße in einen vorbereiteten trockenen Heizblock oder PCR-Thermozykler.

Jede Analyse muss mindestens eine negative Kontrolle enthalten, um das Vorhandensein einer Kontamination zu überprüfen. Als negative Kontrolle wird eine Templatefreie Kontrolle (NTC) verwendet, die PCR-Wasser anstelle einer Gurgelprobe enthält. Jede getestete

Primerkombination (SARS-CoV-2 und RNase P) muss einen eigenen NTC haben. Jede Analyse muss mindestens eine Positivkontrolle enthalten, um den korrekten Verlauf der Analyse und die Funktionalität der Kit-Komponenten zu überprüfen. Als positive Kontrolle enthält die Reaktion das Kontrollmaterial PC SARS-CoV-2 BMC5 anstelle einer unbekannt Probe. Die Positivkontrolle für jede Primerkombination (SARS-CoV-2 und RNase P) muss separat eingeschlossen werden.

Die im Kit gefundene Positivkontrolle (PC SARS-CoV-2 BMC5) ist die einzelsträngige RNA des mit menschlicher RNA angereicherten SARS-CoV-2-Virus. Die PC SARS-CoV-2 BMC5-Positivkontrolle liefert mit allen Primersätzen (SARS-CoV-2 und RNase P) ein positives Ergebnis.

### 7.6. Parameter der RT-LAMP Reaktion

Befolgen Sie die nachstehenden Anweisungen, um Testbedingungen wie Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und optische Kanäle einzustellen.

#### ANMERKUNGEN!

- Wir empfehlen eine thermische Beendigung der Reaktion bei Verwendung der kolorimetrischen Detektion, insbesondere wenn die Ergebnisse nicht innerhalb von einigen Minuten nach Abschluss der Amplifikation ausgewertet werden (sehen Sie unten). Bevor Sie mit dem thermischen Abschluss schritt fortfahren, überprüfen Sie zuerst, ob unschlüssige Proben vorhanden sind.
- Schalten Sie für die Fluoreszenzdetektion die Normalisierung mit einem passiven Referenzfarbstoff (ROX) aus. Dieses Diagnose Kit verwendet ihn nicht.

#### ACHTUNG!

Behandeln Sie Amplifikationsprodukte mit extremer Sorgfalt, um eine Ausbreitung im Labor und eine mögliche Kontamination der zu testenden Gurgelproben zu vermeiden. Verwenden Sie Pipetten, die ausschließlich für die Handhabung von Amplifikationsprodukten entwickelt wurden, und verwenden Sie Einwegfilterspitzen, die als steril und frei von DNA, RNA, DNasen und RNasen zertifiziert sind.

Unter keinen Umständen sollten die Reaktionsgefäße nach der LAMP Reaktion geöffnet werden. Die LAMP Reaktion erzeugt mehr Amplikons

als die PCR Reaktion. Selbst geringere Amplikon-Verunreinigungen können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Obwohl dieses Diagnose Kit dUTP und thermolabile Uracil-DNA-Glycosylase verwendet, um die Auswirkungen einer möglichen Kontamination zu verringern, reicht dieser Ansatz möglicherweise nicht aus, um falsch positive Ergebnisse in Zonen mit stark kontaminierten Amplikons zu verhindern. Wenn bekannt ist, dass die Reaktionsgefäße geöffnet werden, dekontaminieren Sie die Zonen so schnell wie möglich, um Amplikons zu entfernen.

#### Reaktionsparameter:

- Reaktionstemperatur: 65 °C
- Reaktionsvolumen: 20 µl
- Reaktionsdauer:
  - » kolorimetrische Detektion: 45 Minuten ist ein Standard, 55 Minuten für unschlüssige Gurgelproben (sehen Sie den Abschnitt 8. Interpretation von Ergebnissen)
  - » Fluoreszenzdetektion: 45 Minuten ist ein Standard (90 Zyklen), ein Zyklus dauert 30 Sekunden
- Beendigung der Reaktion (optional): 1 Minute bei 95 °C oder schnelles Abkühlen von Reaktionsgefäßen unter 40 °C

#### Optische Kanäle (für Fluoreszenzdetektion):

- Abhängig vom interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, sehen Sie den Abschnitt 7.4. Zubereitung des Reaktionsgemisches.

Wenn Sie die Fluoreszenzdetektion verwenden, befolgen Sie die Anweisung zu Ihrem qPCR-Thermozykler und Ihr internes Verfahren beim Einstellen der Analysebedingungen für die Anzahl der Proben, für den Typ von verwendeten Reaktionsgefäßen bzw. Verteilung der Proben auf der PCR-Platte.

### 7.7. Analyse der Reaktionsergebnisse (kolorimetrische Detektion)

Wenn Sie den Farbwechsel als primäres Mittel zur Analyse der Reaktionsergebnisse und zum Erkennen der positiven Gurgelproben verwenden, befolgen Sie die nachstehenden Anweisungen. Interpretieren Sie die Ergebnisse nach der RT-LAMP Farbatfel, die im Abschnitt 8 zu finden ist.

#### ACHTUNG!

Bewerten Sie kolorimetrische Veränderungen immer in einem gut beleuchteten Raum.

Wenn die Interpretation des Farbwechsels nicht innerhalb einer Stunde nach Beendigung der Reaktion erfolgt, lagern Sie die Reaktionsgefäße im Dunkeln. Das Reaktionsgemisch ist lichtempfindlich und seine Farbe verblasst langsam im Licht (ein wesentlicher Farbverlust kann nach ungefähr zweitägiger Belichtung beobachtet werden).

#### Interpretation des Farbwechsels:

- » Die Probe wird als **positiv** bewertet, wenn die endgültige Farbe der Probe **NICHT den Gruppen 0 bis 1** im RT-LAMP Farbschlüssel entspricht (**die Reaktionsfarbe nähert sich dem Gelbton mehr als die Farbgruppen 0 und 1**).
- » Die Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die endgültige Farbe der Probe **NICHT den Gruppen 1 bis 3** im RT-LAMP Farbschlüssel entspricht (**die Reaktionsfarbe nähert sich dem Rosaton mehr als die Farbgruppen 1 bis 3**).
- » Die Probe wird als **unschlüssig** bewertet, wenn die endgültige Farbe der Probe **der Gruppe 1** im RT-LAMP Farbschlüssel entspricht.



## 7.8. Analyse der Reaktionsergebnisse (Fluoreszenzdetektion)

Im Allgemeinen sind die Einstellung der Basislinie und Schwellenwerte und die Bewertung der Fluoreszenzintensität bei RT-LAMP Reaktionen identisch mit RT-qPCR Reaktionen.

### ANMERKUNG!

Wenn Sie die Fluoreszenzintensität als primäres Mittel zum Nachweis der Amplifikation und zur Bewertung der Reaktionsergebnisse verwenden, folgen Sie das Handbuch des Herstellers für den qPCR-Thermozykler und stellen Sie die Basislinie und den Schwellenwert gemäß den internen Verfahren für diese Art von Assay ein.

## 8. Interpretationsrichtlinien für Ergebnisse

### 8.1. Interpretationsrichtlinien für Ergebnisse – Testkontrollen

#### ACHTUNG!

Eine Abweichung von erwarteten Kontrollergebnissen weist auf eine falsche Einstellung und/oder Durchführung des Tests oder ein Versagen/eine Fehlfunktion von Reagenzien und/oder Geräten hin. Stoppen Sie das Experiment und versuchen Sie es erneut.

#### Nicht-Template-Kontrolle (NTC)

In der Nicht-Template-Kontrolle wird PCR-Wasser

anstelle von RNA verwendet. NTC-Reaktionen aller Primersätzen sollten keinen Farbwechsel zeigen (die Reaktionsmischung bleibt lila/rosa) und die Amplifikationskurven sollten die Schwellenwertlinie bei der Überwachung der Fluoreszenz nicht überschreiten. Wenn eine der NTC-Reaktionen einen Farbwechsel zeigt oder eine Amplifikationskurve aufweist, die die Schwellenwertlinie überschreitet, kann die Probe kontaminiert sein. Stoppen Sie den Test und wiederholen Sie ihn. Befolgen Sie dabei die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Schritte.

#### Positivkontrolle (PC SARS-CoV-2 BMC5)

PC SARS-CoV-2 BMC5 besteht aus lyophilisierter isolierter genomischer RNA des SARS-CoV-2-Virus, angereichert mit menschlicher RNA und einem Co-Präzipitat (d. h. Lachsspermien-DNA und Bäckerhefe-tRNA zur Erhöhung der Stabilität). PC SARS-CoV-2 BMC5 liefert mit allen Primersätzen (SARS-CoV-2 und RNase P) ein positives Ergebnis. Hinweise auf Fehler/Misserfolg bei der Testdurchführung oder Experimentanalyse umfassen: Fehlen eines Farbwechsels bzw. Fluoreszenzsignals, einen unschlüssigen Farbwechsel und/oder eine sehr hohe TTR (> 35 Minuten). Im Falle eines negativen Ergebnisses bei einer positiven Kontrolle ist es nicht möglich, die Richtigkeit anderer positiver / negativer Ergebnisse, die in derselben Analyse erhalten wurden, eindeutig zu bestimmen und zwischen negativen und falsch negativen Ergebnissen zu unterscheiden. Die Ausgabe einer solchen Analyse kann nicht ausgewertet werden. Wiederholen Sie den Test und befolgen Sie dabei die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Schritte.

#### Test für SARS-CoV-2

##### Interpretation durch kolorimetrische Detektion:

- Wenn alle Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigen, wird die Probe als **negativ** bewertet, wenn:
  - SARS-CoV-2 Test **negativ** und humane RNase P **positiv** ist.
- Wenn alle Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigen, wird die Probe als **positiv** bewertet, wenn:
  - Der SARS-CoV-2-Test **positiv** und die humane RNase P **positiv, unschlüssig** oder **negativ** ist. Unter bestimmten Bedingungen kann die Kombination eines positiven SARS-CoV-2-Tests mit einem negativen RNase P-Testergebnis jedoch auf eine Kontamination hinweisen (sehen Sie die Abschnitte: Kontrolle der Probenentnahme bei RNase P bzw. Interpretationshandbuch von Ergebnissen des Vivid COVID-19 LAMP Direct G Diagnose-Kits oben bzw. unten).
- Wenn alle Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigen, wird die Probe als **unschlüssig** bewertet, wenn:
  - Der SARS-CoV-2 Test **unschlüssig** und humane RNase P **positiv, unschlüssig** oder **negativ** ist. Alternativ, der SARS-CoV-2 Test ist **negativ** und humane RNase P ist **unschlüssig**.
  - Markieren Sie die unschlüssigen Proben und inkubieren Sie die Proben für weitere 10 Minuten bei 65 °C. Versuchen Sie danach wieder den Farbwechsel der Proben gemäß dem RT-LAMP-Farb-schlüssel zu klassifizieren. Wenn der Farbwechsel immer noch als unschlüssig angesehen wird, markieren Sie das Testergebnis als ungültig und führen Sie einen neuen Test durch. Wenn Proben in einem Mehrprobenformat (Streifen, Platten usw.) getestet werden, ignorieren Sie alle negativen Proben, die während dieser längeren Inkubationszeit positiv/unschlüssig werden. Um Bedienerfehler zu minimieren, empfehlen wir dringend, die Farbe des resultierenden Reaktionsgemisches vor und nach längerer Inkubation zu dokumentieren.
- Wenn alle Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigen, wird die Probe als **ungültig** bewertet, wenn:
  - Der SARS-CoV-2 Test **negativ** und humane RNase P **negativ** ist.
  - Wenn möglich, testen Sie die Probe erneut. Wenn nicht möglich, entnehmen Sie eine neue Gurgelprobe.

##### Interpretation durch Fluoreszenzdetektion:

- Wenn alle Kontrollen erwartete Ergebnisse zeigen, wird die Probe als **negativ** bewertet, wenn:
  - Das Fluoreszenzsignal des SARS-CoV-2 Tests **NICHT** den Schwellenwert nach 45 Minuten und humane RNase P den Schwellenwert nach 45 Minuten **überschreitet**.
- Wenn alle Kontrollen erwartete Ergebnisse zeigen, wird die Probe als **positiv** bewertet, wenn:
  - Das Fluoreszenzsignal des SARS-CoV-2-Tests den Schwellenwert nach 45 Minuten unabhängig vom Ergebnis der humanen RNase P **überschreitet**. Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch ein positiver SARS-CoV-2-Test in Kombination mit einem negativen RNase P Test auf eine Kontamination hinweisen – sehen Sie bitte die Abschnitte Kontrolle der Probenentnahme bei RNase P bzw. Interpretationshandbuch von Ergebnissen des Vivid COVID-19 LAMP Direct G Diagnose-Kits oben bzw. unten.
- Wenn alle Kontrollen erwartete Ergebnisse zeigen, wird die Probe als **ungültig** bewertet, wenn:
  - Das Fluoreszenzsignal des SARS-CoV-2 Tests und humaner RNase P **NICHT** den Schwellenwert nach 45 Minuten **überschreitet**.
  - Wenn möglich, testen Sie die Probe erneut. Wenn nicht möglich, entnehmen Sie eine neue Probe.

Tabelle 5. Erwartete Ergebnisse der Kontrollen, die im Kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G eingeschlossen sind

Art der Kontrolle	Kontrolle im Kit	SARS-CoV-2	Human RNase P	erwarteter Farbwechsel	erwartete TTR (Fluoreszenz)	mögliche Ursachen unerwarteten Ergebnisses
Positiv	PC SARS-CoV-2 BMC5	+	+	rosa → gelb	TTR < 35 min	Fehlfunktion von Reagenzien Primersätzen Positivkontrolle
Negativ	NTC	-	-	ohne Farbwechsel (rosa)	unentdeckt	Kontamination von Reagenzien und/oder Umgebung

### 8.2. Interpretationsrichtlinien von Ergebnisse – Testproben

#### Test für RNase P (Kontrolle der Probenentnahme)

Alle klinischen Gurgelproben sollten positiv auf den humanen RNase P Primer reagieren. Die Unfähigkeit, RNase P in einer klinischen Gurgelprobe nachzuweisen, kann Folgendes bedeuten:

- Fehlen von menschlichem Zellmaterial aufgrund falscher Gurgeltechnik und/oder fehlerhafter Probenentnahme und/oder Verlust der Probenintegrität.
- Fehlerhafte Handhabung/Verarbeitung /Lagerung von klinischem Material mit daraus resultierendem Verlust von RNA und/oder Abbau von RNA.
- Fehlerhafte Vorbereitung und Testdurchführung
- Fehlfunktion von Reagenzien und/oder Geräte.

Wenn der RNase P-Test für eine klinische Probe negativ ist, interpretieren Sie das Ergebnis wie folgt:

- Wenn der SARS-CoV-2-Test auch ohne positive RNase P Kontrolle positiv ist, sollte das Ergebnis standardmäßig als gültig angesehen werden. Es ist möglich, dass einige Proben keine RNase P-Amplifikation zeigen - ein negatives RNase

P-Signal schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA in einer klinischen Probe nicht aus. Dies ist auf Unterschiede in der Stabilität der humanen Messenger-RNA im Vergleich zur viralen RNA in Gurgelproben und während der Probenverarbeitung zurückzuführen und es ist möglich, dass höhere Empfindlichkeit des SARS-CoV-2-Assays diese Stabilitätsunterschiede unterstützt. Beobachtung jedoch von einem unschlüssigen Farbwechsel und/oder einer sehr hohen TTR (> 35 Minuten) in SARS-CoV-2 Assay mit einer negativen RNase P Kontrolle weisen darauf hin, dass möglicherweise eine Kontamination der Probe aufgetreten ist. In diesem Fall wird empfohlen, den Test nach Möglichkeit zu wiederholen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt Interpretationsrichtlinien für die Ergebnisse des Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Diagnose-Kits.

- Wenn der Test auf SARS-CoV-2 negativ ist, ist das Ergebnis für die Probe als ungültig anzusehen. Wenn die originale Gurgelprobe verfügbar ist, wiederholen Sie den Test. Wenn beide Tests nach dem wiederholten Testen erneut negativ sind, melden Sie die Ergebnisse als ungültig und nehmen Sie nach Möglichkeit eine neue Probe.

**Interpretationshandbuch für Ergebnisse des Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Diagnose-Kits**  
 Die folgende Tabelle zeigt die erwarteten Ergebnisse für das Vivid COVID-19 LAMP Direct-G Diagnose-Kit. Wenn Sie unerwartete/unschlüssige/ungültige Ergebnisse erhalten, die durch wiederholendes Testen nicht beseitigt werden, wenden Sie sich bitte an die zuständigen Gesundheitsbehörden.

Tabelle 6. **Ergebnisinterpretation und entsprechendes Verfahren**

SARS-CoV-2	Humane RNase P	Interpretation	Meldung	Verfahren
+	+	SARS-CoV-2 entdeckt	SARS-CoV-2 positiv	Finalisieren und melden Sie die Ergebnisse <sup>a</sup> .
+	-/?	SARS-CoV-2 entdeckt	SARS-CoV-2 positiv	Nach gründlichem Bedenken <sup>b</sup> finalisieren und melden Sie die Ergebnisse <sup>a</sup> .
?	+/-/?	unschlüssig	unschlüssig	Inkubieren Sie die unschlüssigen Proben für weitere 10 Minuten bei 65°C. Wenn die Proben immer noch unschlüssig sind, ist der Test ungültig und ein erneuter Test ist erforderlich.
-	?			
-	+	SARS-CoV-2 unentdeckt	negativ	Finalisieren und melden Sie die Ergebnisse <sup>a</sup> .
-	-	ungültig	ungültig	Wiederholen Sie den Test. Wenn es wieder ungültig ist, nehmen Sie eine neue Gurgelprobe.

+ = positives Ergebnis

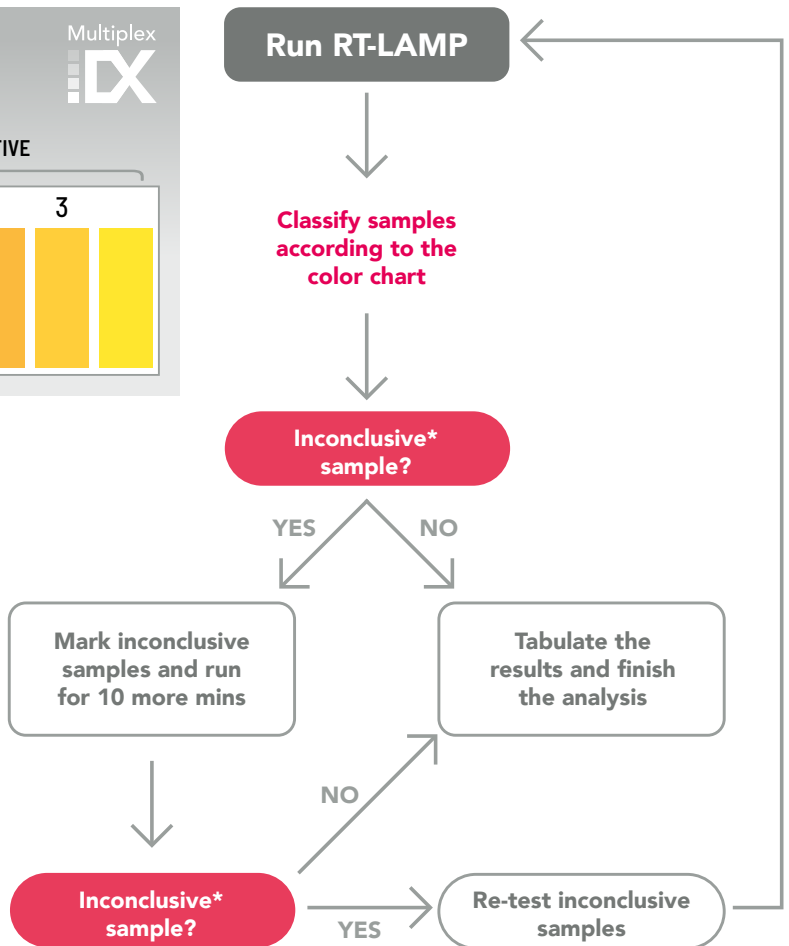
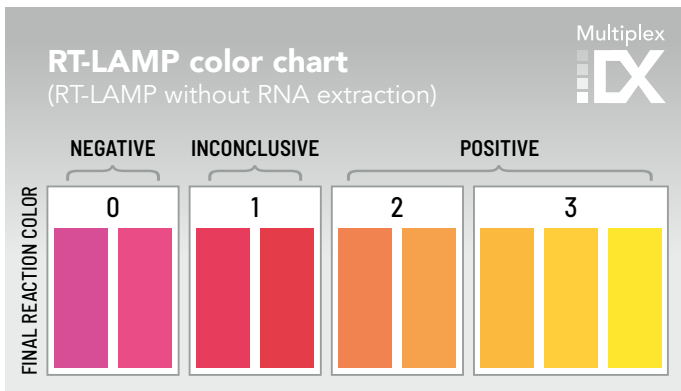
- = negatives Ergebnis

? = unschlüssiges Ergebnis (nur bei kolorimetrischer Detektion)

<sup>a</sup> Laboratorien sollten die Ergebnisse gemäß ihnen entsprechendem Berichtssystem melden.

<sup>b</sup> Die Beobachtung einer unschlüssigen Farbe und/oder einer sehr hohen TTR (> 35 Minuten) im SARS-CoV-2 Test mit einem negativen RNase P-Test kann auf eine Kontamination der getesteten Probe hinweisen. Abhängig von den Umständen empfehlen wir, die Probe erneut zu testen.

<sup>c</sup> Die Möglichkeit falsch negativer Ergebnisse sollte in Betracht gezogen werden, insbesondere wenn klinische Anamnese des Patienten auf COVID-19 hinweist und diagnostische Tests für andere Krankheiten (z. B. andere Atemwegserkrankungen) negativ sind. Der optimale Zeitpunkt für eine Probenentnahme bei einer hohen viralen Belastung der SARS-CoV-2-Infektion wurde nämlich nicht festgelegt, deshalb wird es empfohlen, bei Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion mehrere Proben zu nehmen und nach Absprache mit den zuständigen Gesundheitsbehörden erneute Tests durchzuführen.



\* Color classified by the operator as group 1

## 9. Funktionsmerkmale des Kits

### 9.1. Detektionslimit des Kits

Analytische Bewertung der Empfindlichkeit (Detektionslimit) wurde mit einem Satz von Primern für den SARS-CoV-2 Nachweis durchgeführt. Der Test wurde mit der standardisierten Positivkontrolle „SARS-CoV-2-Standard“ (Exact Diagnostics) durchgeführt, die im unverdünnten Zustand 200 Kopien der synthetischen Matrize pro 1 µl enthält.

Verdünnungen wurden durch Reihenverdünnung der Positivkontrolle vorbereitet, was zur Proben mit folgenden Konzentrationen führte: 16,667 Kopien/µl (= 50 Kopien/Reaktion), 8,333 Kopien/µl (= 25 Kopien/Reaktion), 5 Kopien/µl (= 15 Kopien/Reaktion), 3,333 Kopien/µl (= 10 Kopien/Reaktion) a 1,667 Kopien/µl (= 5 Kopien/Reaktion), die in der analytischen Bewertung der Empfindlichkeit verwendet werden. Die Bewertung wurde in 8 Replikaten pro jede Konzentration durchgeführt (3 µl verdünnter Positivkontrolle in jeweiliger Konzentration (obenbeschrieben) pro Reaktion).

Der Test bestätigte hohe Empfindlichkeit des **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Diagnose-Kits. Das Kit detektierte zuverlässig bis 10 Kopien pro Reaktion (3,333 Kopien/µl), was auch in einem erweiterten LoD-Experiment bestätigt wurde, bei dem 23 der 24 Replikate als positiv sowohl durch kolorimetrische als auch Änderung der Fluoreszenzintensität detektiert wurden (mehr als 95% Erkennungserfolg).

Tabelle 7. **Detektionslimit des SARS-CoV-2-Tests**

Kopien/ Reaktion	Gesamtanzahl der Replikate	positive Ergebnisse		unschlüssige Ergebnisse	Detektionserfolg (%)	
		kolorimetrisch	bei Fluoreszenz	kolorimetrisch	kolorimetrisch	bei Fluoreszenz
50	8	8/8	8/8	0/8	100%	100%
25	8	8/8	8/8	0/8	100%	100%
15	8	8/8	8/8	0/8	100%	100%
10	8	7/8	7/8	0/8	87.5%	87.5%
5	8	3/8	4/8	1/8	37.5%	50%
10*	24	23/24	23/24	0/24	95.8%	95.8%
5*	24	14/24	15/24	0/24	58.3%	62.5%

\* Erweitertes LoD Experiment für 10 und 5 Kopien/Reaktion

### 9.2. Spezifität des Kits

Bewertung der Spezifität gegen Krankheitserreger (Kreuzreaktivität mit anderen Coronaviren oder Atemwegsviren) wurde unter Verwendung des Kontrollmaterials „Coronavirus RNA specificity panel“ (EVAg, European Virus Archive - Global) durchgeführt, das folgende RNA Viren enthält: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, SARS-CoV HKU39849 a MERS-CoV. Zusätzlich wurde das Set mit Atemwegsviren (Vircell) verwendet, das RNA von dem Influenzavirus A H1N1, neuem Influenzavirus A H1N1, Influenzavirus A H3N2, Influenzavirus A H5N1, neuem Influenzavirus B, humanen Parainfluenzavirus, respiratorischen Syncytial-Virus und humanen

Rhinovirus beinhaltet. Das RNA Material von jedem Virus ist in separaten Röhrchen. Der Spezifitätstest wurde in 3 Replikaten für jedes obenbeschriebenes Virus durchgeführt, wobei EVAg-Viren mit 3 µl pro Reaktion und Vircell-Viren mit 1000 Kopien pro Reaktion getestet wurden.

Der Test bestätigte hohe Spezifität des **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Diagnose-Kits. Ein positives Ergebnis wurde ausschließlich in Gegenwart von SARS-CoV-2-RNA und Primern für SARS-CoV-2 entdeckt.

LAMP-Methode ist bekannt nichtspezifische Amplifikation auch in der Abwesenheit von tatsächlichem Template

zu produzieren. Um zu zeigen, dass **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Diagnose-Kit keine unspezifischen Amplifikationsprodukte erzeugt, wurden 48 NTC-Reaktionen mit Primersätzen für SARS-CoV-2 und RNase P getestet. Bei bestimmungsgemäßer Verwendung wurden keine unspezifischen Produkte entdeckt – alle 48 NTC-Reaktionen wurden mit Primersätzen für SARS-CoV-2 und RNase P durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst und zeigen, dass beide Primersätze für SARS-CoV-2 und RNase P keine unspezifische Produkte weder bei kolorimetrischen Erkennung noch bei Fluoreszenz.

Tabelle 8. **Bewertung der unspezifischen LAMP Amplifikation**

Primersatz	Gesamtanzahl der Replikate	positive Ergebnisse		Erfolg unspezifischer Amplifikation (%)
		kolorimetrisch	bei Fluoreszenz	
SARS-CoV-2	48	0/48	0/48	0%
RNase P	48	0/48	0/48	0%

### 9.3. Bewertung der klinischen Leistung

Die klinische Leistung des **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Diagnose-Kits wurde an einer Kohorte von 72 Patienten durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Analyse keinen bestätigten SARS-CoV-2-Virusstatus hatten. Alle analysierten Proben wurden durch Gurgeln gemäß den Anweisungen in diesem Dokument entnommen. Gleichzeitig wurde in den Patientenproben das Vorhandensein von viraler RNA durch RT-qPCR-Methode getestet, die als Standardmethode von regionalen Gesundheitsbehörden der Slowakischen Republik verwendet wird. Die Bewertung von **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Kit basierte auf einem Vergleich der Endergebnisse der LAMP-Methode mit der RT-qPCR-Referenzmethode, wobei die Standard-RNA-Extraktion nur für die Referenzmethode durchgeführt wurde, und für **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Kit wurden die Proben auf die in diesem Dokument empfohlene Weise verarbeitet. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden (E-Gen und RNase P für die Referenzmethode und SARS-CoV-2 und RNase P für die Testmethode) wurden gemäß den empfohlenen Anweisungen für die angegebenen Methoden bewertet.

Die Prüfung dieses ausgewählten Probensatzes wurde mit verblindeten Proben und in einem externen

Labor durchgeführt, das an der Internationalen Qualitätsbewertung (External Quality Assessment – EQA) beteiligt war, die in Institutionen wie European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Institute of Virology, Charité (Berlin, Deutschland) und National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Niederlande) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der klinischen Leistungsbewertung sind in der Tabelle 9 zusammengefasst. 8 Proben wurden aufgrund unschlüssiger oder ungültiger Ergebnisse von der Analyse ausgeschlossen (5 für die Referenzmethode, 3 für die Testmethode). Die Daten zeigten, dass das **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Kit eine diagnostische Gesamtspezifität von 100% und Gesamtsensitivität von 65,5% im Vergleich zur Referenzmethode bei Verwendung kolorimetrischer als auch Fluoreszenzdetektion hat. Für Proben mit Ct<32 gemäß der Referenzmethode wurde bei der Testmethode die Empfindlichkeit von 100% erkannt. Die Ergebnisse bestätigten eindeutig die Fähigkeit des **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Kits, genomische SARS-CoV-2-RNA in Proben nachzuweisen, die durch Gurgeln mit minimaler Verarbeitung und ohne RNA Extraktion/Konzentration entnommen wurden.

Tabelle 9: Bewertung der klinischen Leistung des **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** Kits

		RT-qPCR-Referenzmethode (E Gen)			Ct-Werte gemäß der Referenzmethode	Empfindlichkeit
		positiv	negativ	Gesamt		
Vivid COVID-19 LAMP Direct-G	positiv	21	0	21	das ganze Set (Ct ≤ 40) (32 positive Ergebnisse gemäß RT-qPCR)	65.6%
	negativ	11	32	43	Ct < 35 (25 positive Ergebnisse gemäß RT-qPCR)	80%
	Gesamt	32	32		Ct < 32 (16 positive Ergebnisse gemäß RT-qPCR)	100%
		<b>Empfindlichkeit:</b> 65.6%	<b>Spezifität:</b> 100%		Ct < 28 (7 positive Ergebnisse gemäß RT-qPCR)	100%

### 10. Abfallwirtschaft

#### ANMERKUNGEN!

- Dekontaminieren Sie alle mit Gurgelproben in Kontakt gekommenen Materialien entweder mit 3% Natriumhypochlorit mindestens für 30 Minuten oder autoklavieren Sie die Materialien mindestens für 60 Minuten bei 121 °C.
- Alle verwendeten Geräte, Spitzen, Schläuche, Arbeitsmaterialien und Schutzkleidung sollten gemäß den geltenden Vorschriften zur Entsorgung infektiöser Abfälle als potenziell kontaminiert und entsorgt werden.
- Entsorgen Sie die restlichen Reagenzien und Materialien gemäß den Sicherheitsbestimmungen.

### 11. Behebung möglicher Probleme

Bei Problemen wenden Sie sich an:







**MultiplexDX, s. r. o.**  
Hersteller



Adresse: Ilkovičova 8  
841 04 Bratislava, Slowakei

Tel.: +421 2 902 68 310

Email: [vigilance@multiplexdx.com](mailto:vigilance@multiplexdx.com)

### 12. Verwendete Symbole und Markierungen

	Hersteller
	Chargennummer
	Empfohlene Lagertemperatur
	Packungsgröße
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Richtlinie 98/79/ES über <i>in-vitro</i> Diagnostika
	Herstellungsdatum
	In-vitro Diagnostika
	Beachten Sie die Sicherheitshinweise in der mitgelieferten Gebrauchsanweisung.

  Registrierungscode: P 2138A

 **MultiplexDX, s. r. o.**  
IČO: 50 111 965  
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava  
Slowakei  
+421 2 902 68 310  
[info@multiplexdx.com](mailto:info@multiplexdx.com)



© 2021 MultiplexDX, s. r. o. Alle Rechte vorbehalten.  
Alle anderen Produktnamen und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Besitzer.