

COV19 qcLAMP kit

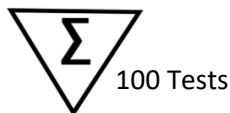
CE IVD

REF 000055

GEBRAUCHSANWEISUNG (IFU)
Zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnose
Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal
Nicht zum Selbsttest vorgesehen



BIOPIX-T



BIOPIX DNA TECHNOLOGY P.C.
Science and Technology Park of Crete
N. Plastira 100, Vassilika Vouton
GR-700 13, Heraklion, Griechenland



www.biopix-t.com



info@biopix-t.com



(+30) 281 0391986

EINLEITUNG

Angabe gemäß EU-IVD-Richtlinie 98/79/EG

1. Produktkategorie: IVD-Kit
2. Produktname: COV19-qcLAMP-Kit
3. Produktkatalognummer: Kat.-Nr. 000055
4. Verwendungszweck: Siehe Abschnitt „Verwendungszweck“

Anfragen und Kundenservice (A/S)

Bei Fragen zu dem Produkt senden Sie uns eine E-Mail (info@biopix-t.com).

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	3
Produktbeschreibung.....	3
Inhalt und Bestandteile des Kits	3
Lagerungs- und Handhabungsanforderungen	4
Haltbarkeit des Kits	4
Zusätzlich benötigte, aber nicht enthaltene Materialien und Ausrüstung.....	4
Warn- und Sicherheitshinweise	5
Vorbereitung der Reagenzien	8
Probenahme, Handhabung und Vorbereitung vor der Testung.....	8
Testverfahren.....	9
Interpretation der Ergebnisse	11
Beschränkungen des Verfahrens	13
Leistungseigenschaften.....	14
Nachweisgrenze	14
Beurteilung der Empfindlichkeit, Spezifität und Genauigkeit der Analysen.....	14
Beurteilung der klinischen Empfindlichkeit und Spezifität	Error! Bookmark not defined.
Verwendete Symbole und Erklärung	16
Technischer Support	17
Literaturnachweise	18
Abkürzungen	18

Verwendungszweck

Das COV19-qcLAMP-Kit ist ein molekular diagnostischer In-vitro-Test, der für die Verwendung zum Nachweis von SARS-CoV-2-Virus-RNA in Verbindung mit der PEBBLE-qcLAMP-Point-of-Care-Plattform vorgesehen ist.

Das COV19-qcLAMP-Kit benötigt keine Extraktion viraler RNA und kann auf Nasopharyngeal- und Oropharyngeal-Abstrichproben angewandt werden, die bei Personen mit Verdacht auf COVID-19 entnommen wurden. Zudem kann das Kit auf extrahierte RNA angewandt werden.

Die SARS-CoV-2-RNA ist gemeinhin in Proben der oberen Atemwege während der akuten Phase der Infektion nachweisbar. Positive Ergebnisse zeigen die Anwesenheit von SARS-CoV-2-RNA an. Zur Bestimmung des Infektionsstatus des Patienten sind eine klinische Korrelation mit der Patientenanamnese und andere diagnostische Informationen nötig. Bei positiven Ergebnissen ist eine bakterielle Infektion oder Koinfektion mit anderen Viren nicht ausgeschlossen.

Negative Ergebnisse sollten als potenziell negativ betrachtet werden und schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus. Sie sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zum Patientenmanagement herangezogen werden. Negative Ergebnisse sind zusammen mit klinischen Befunden, der Patientenanamnese und epidemiologischen Informationen zu betrachten.

Das COV19-qcLAMP-Kit ist zur Verwendung durch geschultes Personal oder Mediziner (Fachkräfte) vorgesehen, die mit der Durchführung von Tests mit der Pebble-qcLAMP-Plattform vertraut sind. Es ist nicht für den Gebrauch zum Selbsttest vorgesehen.

Produktbeschreibung

Das COV19-qcLAMP-Kit ist ein Kit für einen Nukleinsäureamplifikationstest (NAAT) auf Grundlage der kolorimetrischen Echtzeit-LAMP-Methode (qcLAMP) zum Nachweis eines N-Gen-RNA-Ziels von SARS-CoV-2. Das COV19-qcLAMP-Kit benötigt keine RNA-Extraktion und kann auf Nasopharyngeal- und Oropharyngeal-Abstrichproben angewandt werden. Alternativ kann das Kit zudem auf extrahierte RNA angewandt werden.

Das Kit beinhaltet ein 2X Enzymgemisch, das eine Mischung aus Bst-Polymerase und thermostabiler reverser Transkriptase, optimiertem Reaktionspuffer, Mg^{2+} und dNTPs enthält. Es umfasst zudem ein separates 5X COV19-Primergemisch aus SARS-CoV-2-spezifischen Primern und dem Indikator Hydroxynaphtholblau (HNB) und ein 5X Kontrollprimergemisch zum Amplifizieren eines humanen endogenen Ziels (RNase P). Der mitgelieferte 2X BPX-Probenpuffer neutralisiert gängige Probeninhibitoren zur direkten Amplifikation und zum Nachweis bei unverarbeiteten Proben. Das Kit enthält zudem Mineralöl, das dazu beiträgt, Kreuzkontamination zu verhindern und Verdunstung zu minimieren.

Jedes Kit reicht für 100 Reaktionen. Die Tests werden in der Pebble-qcLAMP-Plattform durchgeführt, welche die Reaktionstemperatur und -zeit steuert und die digitale kolorimetrische Echtzeitanalyse der Amplifikationsreaktionen erleichtert. Die Gesamtdauer des Tests in der Pebble-qcLAMP-Plattform beträgt 30 Minuten zum Feststellen eines negativen Ergebnisses. Die Zeit bis zum Eintreten eines positiven Ergebnisses kann im Bereich zwischen 10 und 27 Minuten je nach der anfänglichen Zielkonzentration liegen.

Inhalt und Bestandteile des Kits

Das COV19-qcLAMP-Kit enthält die folgenden Bestandteile zum Durchführen von **100 qcLAMP-Tests/Reaktionen**:

Bestandteile des COVID-19-qcLAMP-Kits

Bestandteil	Menge	Volumen	Beschreibung
2X Enzymgemisch	1 Röhrchen	1,25 ml	Farblose Lösung / schwarze Kappe
5X COVID-19-Primergemisch	1 Röhrchen	0,5 ml	Violette Lösung / violette Kappe
5X Kontrollprimergemisch	1 Röhrchen	0,25 ml	Violette Lösung / grüne Kappe
Nuklease-freies Wasser	1 Röhrchen	1,0 ml	Farblose Lösung / weiße Kappe
2X BPX-Probenpuffer	6 Röhrchen	1,8 ml	Farblose Lösung / transparente Kappe
Mineralöl	1 Röhrchen	1,8 ml	Farblose Lösung / blaue Kappe

Lagerungs- und Handhabungsanforderungen

Bei Erhalt sollten die Bestandteile der Kits bei -20 °C in der Originalverpackung gelagert werden. Während der Vorbereitung der Testreaktionen sollten sämtliche Materialien mit Ausnahme des Mineralöls auf Eis oder in einem gekühlten Lagerbehälter ($0-4\text{ °C}$) aufbewahrt werden. Das Mineralöl kann während der Handhabung der Materialien bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Eine unsachgemäße Handhabung der Kitbestandteile kann zur Beeinträchtigung des COVID-19-qcLAMP-Kits und infolgedessen zu falschen Ergebnissen führen!

Es wird empfohlen, vor der ersten Verwendung des COVID-19-qcLAMP-Kits einen Teil des Ausgangsvolumens der Reagenzien des **2X Enzymgemischs** und des **5X COVID-19-Primergemischs** aufzuteilen, um die Gefahr einer Beeinträchtigung des Kits aufgrund mehrfacher Gefrier-Auftau-Zyklen zu verringern. Vermeiden Sie mehr als 2 Gefrier-Auftau-Zyklen.

Haltbarkeit des Kits

Das Kit ist für 12 Monate bei -20 °C stabil.

Zusätzlich benötigte, aber nicht enthaltene Materialien und Ausrüstung

Zu Materialien und Bestandteilen, die zum Nachweis von SARS-CoV-2 erforderlich sind und nicht im Kit enthalten sind, gehören:

Zur Verwendung bei Proben mit extrahierter RNA und unverarbeiteten Proben:

- Kits zur Entnahme und zum Transport von Proben mit Viren, welche die oberen Atemwege betreffen
- Die Pebble-qcLAMP-Point-of-Care-Plattform (BIOPIX-T)
- Positivkontrollen (synthetisch RNA-Matrize oder Plasmid) wie etwa BIO-RAD Synthetic Molecular Standards für SARS-CoV-2 oder Gleichwertiges und Negativkontrollen (genomische DNA oder RNase-freies Wasser).
- Sonstige Ausrüstung und Materialien:

- 1 Einstellbare kalibrierte Pipetten (10 µL, 20 µL, 200 µL und 1000 µL).
- 2 Sterilisierte Pipettenfilterspitzen (10 µL, 20 µL, 200 µL und 1000 µL).
- 3 Multiply-Pro PCR Einzelröhrchen, 0,2 ml von SARSTEDT, Kat. Nr. 72.737.002 (DNA-frei, DNase-/RNase-frei, PCR-Inhibitor-frei) oder ein anderes gleichwertiges PCR-Einzelröhrchen (0,2 ml) mit den folgenden Spezifikationen:
Spezifikationen: Sicherer Verschluss, hochprofilerte Mini-PCR-Röhrchen.
Abmessungen: Höhe mit Deckel: 21,6 mm-21,7 mm, Außendurchmesser (AD): 5,9 mm-6,1 mm.
- 4 PCR-Röhrchen mit einem maximalen Volumen von 1,5 ml.
- 5 DNA- und RNA-Abbaulösungen wie etwa DNAZap™, RNAZap™, 10%ige Bleiche (1:10-Verdünnung von handelsüblichem Natriumhypochlorit mit 5,26–6,0 %) oder gleichwertig.
- 6 Schutzausrüstung (pulverfreie Wegwerfhandschuhe und Laborkittel).

Nur bei Verwendung mit extrahierter RNA:

- E. RNA-Extraktionskits und Instrumente zur Extraktion von Gesamt-RNA aus klinischen Proben.

Warn- und Sicherheitshinweise

1. Zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnose (IVD).
2. Das COV19-qcLAMP-Kit ist nur für den Nachweis von Nukleinsäuren aus SARS-CoV-2 und nicht für andere Viren und Erreger zertifiziert.
3. Die Reagenzien sollten auf kleinere Volumina aufgeteilt werden, sofern sie nicht direkt verwendet werden, um mehrere Gefrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden.
4. Die Probenverarbeitung sollte gemäß der biologischen Schutzstufe 2 (BSL-2) oder höheren Richtlinien erfolgen.
5. Öffnen Sie die Röhrchen nach Ende der qcLAMP-Reaktionen nicht, um eine Verunreinigung der Umgebung mit DNA-Amplicons zu vermeiden.
6. In Bereichen, in denen Reagenzien vorhanden sind und menschliche Proben gehandhabt werden, darf nicht gegessen, getrunken, geraucht, Kosmetik aufgetragen oder mit Kontaktlinsen hantiert werden.
7. Die Verwendung des COV19-qcLAMP-Kits und die Datenauswertung sind geschultem Personal vorbehalten.
8. Verwenden Sie keine Bestandteile des COV19-qcLAMP-Kits nach Ablauf des Verfallsdatums.
9. Das COV19-qcLAMP-Kit wurde zur Verwendung mit der Pebble-qcLAMP-Plattform optimiert.
10. Vor der Verarbeitung der Probe prüfen Sie bitte die Trübheit und Viskosität der Probe. Trübe und viskose Proben können die Reaktion und damit die Ergebnisse beeinflussen. Bei sehr trüben Proben empfehlen wir Verdünnungen der Abstrichproben von 1:10 oder 1:100 vor Fortsetzung der Testung. Dadurch wird jedoch auch die Nachweisgrenze (LOD) des COV19-qcLAMP-Tests gesenkt.
11. Entsorgen Sie nicht verwendete und verwendete Reagenzien, Behälter und menschliche Proben gemäß nationalen, regionalen und lokalen Vorschriften.
12. Tragen Sie geeignete persönliche Schutzausrüstung z. B. Handschuhe, Kittel, Augenschutz) beim Umgang mit klinischen Proben.

Die folgenden Warnhinweise sollten bei Verwendung des Kits berücksichtigt werden:

Warnung	Ursache	Empfehlung
---------	---------	------------

Die Ausgangsfarbe des 5X COV19-Primergemischs und des 5X Kontrollprimergemischs ist nicht violett.	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagern Sie das Kit bei –20 °C.
	Die Kitreagenzien waren zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt.	Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen.
Die Ausgangsfarbe der Reaktion ist himmelblau (vor Einsetzen in die Pebble-qcLAMP-Plattform).	Die Reaktion wurde nicht sachgemäß vorbereitet.	Stellen Sie eine sachgemäße Mischung der Reagenzien und die Genauigkeit der pipettierten Volumen sicher. Mischen Sie die Komponenten 2X Enzymgemisch, 5X COV19 Primergemisch und 5X Kontroll-Primer vor der Vorbereitung des Tests und nach der Vorbereitung des Tests und vor dem Einsetzen in die qcLAMP-Plattform von Pebble intensiv.
	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagern Sie das Kit bei –20 °C.
	Das Kit wurde nach dem Verfallsdatum verwendet.	Vor dem Verfallsdatum verwenden.
	Die Kitreagenzien waren zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt.	Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen.
	Die Kitreagenzien waren zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt.	Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen.
Reaktionen der Positivkontrollen weisen keine Amplifikation auf.	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagern Sie das Kit bei –20 °C.
	Das Kit wurde nach dem Verfallsdatum verwendet.	Vor dem Verfallsdatum verwenden.
	Die Reaktion wurde nicht korrekt vorbereitet.	Stellen Sie eine sachgemäße Mischung der Reagenzien und die Genauigkeit der pipettierten Volumen sicher. Mischen Sie die Komponenten 2X Enzymgemisch, 5X COV19 Primergemisch und 5X Kontroll-Primer vor der Vorbereitung des Tests und nach der Vorbereitung des Tests und vor dem Einsetzen in die qcLAMP-Plattform von Pebble intensiv.
	Es wurde keine RNA hinzugefügt.	Stellen Sie sicher, dass der Reaktion eine Probe zugesetzt wurde.
	Die RNA-Positivkontrolle hat sich zersetzt.	Vermeiden Sie mehrere Gefrier-Auftau-Zyklen und teilen sie die Reagenzien passend auf.
	Die Kitreagenzien sind mit RNasen verunreinigt.	Verwenden Sie Lösungen (z. B. Ethanol, Chlorlösung, Detergens) zum Reinigen der Oberflächen und der Geräte. Verwenden Sie Schutzausrüstung. Ersetzen Sie den bevorratete Reagenzien durch neue Materialien.
	Die Kitreagenzien waren zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt.	Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen.
Proben mit extrahierter RNA weisen keine Amplifikation auf.	Der Extraktionsvorgang wurde unsachgemäß durchgeführt.	Verwenden Sie das 5X Kontrollprimergemisch zur Verifizierung des Extraktionsvorgangs. Wenn es keine Amplifikation zeigt,

		wiederholen Sie den Extraktionsprozess.
	Die Viruslast liegt unter der Nachweisgrenze.	Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus. Sie sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zum Patientenmanagement herangezogen werden. Die Probenahme und Testung sollten zumindest nach 24 h wiederholt werden.
	Die Reaktion wurde nicht korrekt vorbereitet.	Achten Sie auf das richtige Mischen der Reagenzien und die Genauigkeit der pipettierten Volumina. Mischen Sie die Komponenten 2X Enzymgemisch, 5X COV19 Primergemisch und 5X Kontroll-Primer vor der Vorbereitung des Tests und nach der Vorbereitung des Tests und vor dem Einsetzen in die qcLAMP-Plattform von Pebble intensiv.
Unverarbeitete Proben weisen keine Amplifikation auf.	Unverarbeitete Proben enthalten Schleim oder Blut.	Verringern Sie die Viskosität durch 10x oder 100x Verdünnen der Abstrichproben, bevor Sie fortfahren, oder entnehmen Sie die Abstrichprobe erneut.
	Die Viruslast liegt unter der Nachweisgrenze.	Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus. Sie sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen zum Patientenmanagement herangezogen werden. Die Probenahme und Testung sollten zumindest nach 24 h wiederholt werden.
	Die Reaktion wurde nicht korrekt vorbereitet.	Achten Sie auf das richtige Mischen der Reagenzien und die Genauigkeit der pipettierten Volumina. Mischen Sie die Komponenten 2X Enzymgemisch, 5X COV19 Primergemisch und 5X Kontroll-Primer vor der Vorbereitung des Tests und nach der Vorbereitung des Tests und vor dem Einsetzen in die qcLAMP-Plattform von Pebble intensiv.
Negative Reaktionen weisen eine Amplifikation auf.	Kontamination der Proben mit RNA.	Öffnen Sie niemals die Reaktionsröhrchen nach der Amplifikation. Verwenden Sie nur Röhrchen mit sicheren Deckeln, die vorher noch nicht verwendet worden sind. Verwenden Sie DNA-Abbaulösung oder 10%ige Chlorbleichlauge, um den Arbeitsraum und die Ausrüstung

		zu reinigen. Ersetzen Sie den bevorratete Reagenzien durch neue Materialien. Wechseln Sie die Pipettenspitzen zwischen den Proben aus.
	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagern Sie das Kit bei –20 °C.
	Die Kitreagenzien wurden zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen unterzogen.	Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen.
	Amplifikation außerhalb der Matrize.	Sämtliche Reaktionen sollten vor der Amplifikation eingerichtet und auf Eis gehalten werden. Führen Sie die qcLAMP-Reaktionen unmittelbar vor der Vorbereitung aus.

Vorbereitung der Reagenzien

Sämtliche Reagenzien sind mischbereit und werden ohne weitere Vorbereitung verwendet.

Es wird empfohlen, vor der ersten Verwendung des COV19-qcLAMP-Kits einen Teil des Ausgangsvolumens der Reagenzien des **2X Enzymgemischs** und des **5X COV19-Primergemischs** aufzuteilen, um die Gefahr einer Beeinträchtigung des Kits aufgrund mehrfacher Gefrier-Auftau-Zyklen zu verringern. Vermeiden Sie mehr als 2 Gefrier- und Auftau-Zyklen.

Probenahme, Handhabung und Vorbereitung vor der Testung

Es wird empfohlen, sämtliche geöffneten Reaktionsröhrchen baldmöglichst aufzubauchen. Verwenden Sie die Kitbestandteile vor dem Verfallsdatum gemäß Herstellerempfehlungen. Es ist sehr wichtig, Instrumente und Reagenzien zu verwenden, die frei von RNasen sind. Darüber hinaus wird empfohlen, Vorbereitungsschritte in Bereichen, die frei von Nukleasen sind, nur mittels Pipetten mit Filterspitzen auszuführen.

Bei Testung mit extrahierter RNA zu befolgen:

Probenahmevergung:

1. Entnehmen Sie Nasopharyngeal- und Oropharyngeal-Abstrichproben in einem beliebigen Lösungsmittel.
2. Scheiden Sie 200 µl der entnommenen Probe ab und führen Sie eine RNA-Extraktion aus. Verdünnen Sie die extrahierte RNA in 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser und legen Sie diese umgehend auf Eis und lagern Sie sie bei -20 °C.

Bei Testung mit einer unverarbeiteten Probe zu befolgen:

Zum Durchführen eines Tests ohne RNA-Extraktion sollten Nasopharyngeal- und/oder Oropharyngeal-Abstrichproben in einer der folgenden Lösungen löslich gemacht werden: Nur KOMPATIBLE virale Transportmedien können in Kombination mit dem COV19-qcLAMP-Kit verwendet werden (Tabelle 1). Ein nicht kompatibles virales Transportmedium NIEMALS in Kombination mit dem COV19-qcLAMP-Kit (Tabelle 2) verwenden!

Tabelle 1: Kompatibles virales Transportmedium

Kompatibles virales Transportmedium	
Marke	Beschreibung
Kochsalzlösung, 0,9 % in Wasser	Natriumchloridlösung

CITOSWAB®	Virales Transportmedium -VTM-, 3 ml).
Improviral™	Virenkonservierungsmedium -VPM-, 3 ml
Liofilchem®	Virustransportmedium -VTM-, 3 ml
Bioprepäre Mikrobiologie	Virus-Transportmedium (GLYE)
Sansure Biotech	Probenlagerungsreagenz (REF.-Nr. X1002E)

Tabelle 2: NICHT kompatibles virales Transportmedium

NICHT kompatibles virales Transportmedium	
Marke	Beschreibung
Biocommma	Virustransport- und Konservierungsmedium (inaktiviert)
MWE	Virustransportmedium mit Virocult
LITUO	Einweg-Virus-Probenahme-Kit
Zymo DNA/RNA-Schutzschild-Reagenz	Transport- und Speichermedium
Biobase China VTM Tupferprobenentnahme	Einweg-Virenprobenröhrchen-Kit

Die Probenahme sollten wie folgt ausgeführt werden:

1. Entnehmen Sie Nasopharyngeal- und Oropharyngeal-Abstrichproben in einem Lösungsmittel.
2. Scheiden Sie 100 µl der entnommenen Probe ab und durchmischen Sie diese gründlich mit 100 µl der 2X BPX-Probenpufferlösung. Unverzüglich verbrauchen.

Testverfahren

Vor dem Testverfahren muss die Probenvorbereitung befolgt werden. Bewahren Sie die vorbereiteten Proben bis zum Gebrauch auf Eis auf.

Bewahren Sie die Röhrchen aus dem COV19-qcLAMP-Kit (2X Enzymgemisch, 5X COV19-Primergemisch, 5X Kontrollprimergemisch, Nuklease-freies Wasser) und die Reaktionen während der Vorbereitung auf Eis oder in einem Eisschrank auf. Das Mineralöl könnte während der Vorbereitung der Tests bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

A. Bei Proben mit extrahierter RNA zu befolgen:

1. Pipettieren Sie vor dem Vorbereiten eines Gemischs die Lösung aus dem 2X Enzymgemisch und der Lösung des 5X COV19-Primergemischs vorsichtig auf und ab.
2. Bereiten Sie einen oder mehrere Tests vor, wie in den folgenden Tabelle angegeben, und legen Sie diese auf Eis. Die Vorbereitung von 25 µl zur Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in einem 0,2-ml-Röhrchen (nicht im Kit enthalten) wird gemäß den folgenden Anweisungen durchgeführt. Für die Vorbereitung von 6 Proben ist es besser, eine Mastermischung vorzubereiten. Vor der Zugabe der 2 µl extrahierter RNA aliquotieren Sie die Mischung in 6 verschiedene Röhrchen mit einem Gesamtvolumen von 23 µl in jedem von ihnen. Geben Sie dann 2 µl der extrahierten RNA aus jeder Probe in ein anderes Röhrchen. Geben Sie die Reagenzien in der folgenden Reihenfolge in jedes Röhrchen (Tabelle 3).

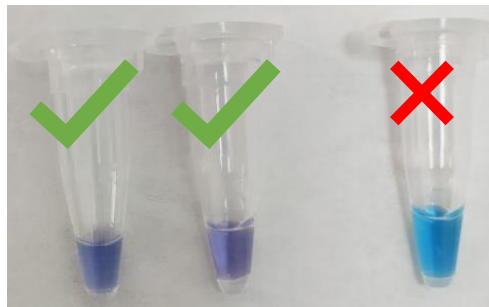
Tabelle 3: Einrichten der Probe(n) unter Verwendung extrahierter RNA

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)	Volumen pro 6 Reaktionen (µL)
----------------	----------------------------------	--------------------------------------

2X Enzymgemisch	12,5	75
5X COV19/Kontroll-Primergemisch	5	30
Nukleasefreies Wasser	5,5	33
Extrahierte RNA	2	2 in jedem Röhrchen
Gesamtvolumen	25	150

Das Gesamtvolumen pro Reaktion sollte 25 µl betragen.

Hinweis! Die Ausgangsfarbe der 25-µl-qcLAMP-Reaktion sollte violett oder dunkelblau sein (siehe folgende Abbildung – linkes Röhrchen). Wenn die Farbe himmelblau ist (siehe folgende Abbildung – rechtes Röhrchen), führen Sie den Test nicht durch. Zu weiteren Informationen lesen Sie den Abschnitt zu Warn- und Sicherheitshinweisen.



- Fügen Sie vorsichtig 15 µl Mineralöl seitlich in jedes Röhrchen hinzu und warten Sie für ca. 30 s, bis es eine Schicht über der qcLAMP-Reaktion bildet. Vergewissern Sie sich, dass sich das Öl nicht mit der Reaktion mischt.
- Geben Sie die Reaktionen in die Pebble-qcLAMP-Plattform und führen Sie die Tests unter Befolgung der Gebrauchsanweisung für die Pebble-qcLAMP-Plattform durch. Die maximale Anzahl der Proben, die gleichzeitig analysiert werden können, liegt bei 6.

Zur Verifizierung einer sachgemäß durchgeführten RNA-Extraktion kann das obige Verfahren zum Nachweis eines humanen endogenen Ziels (interne Kontrolle, IK), des RNase-P-Gens, durch Ersetzen des 5X COV19-Primergemischs durch das 5X Kontrollprimergemisch wiederholt werden. Verwenden Sie die 5X Kontrollprimergemischlösung zum Durchführen dieses Tests. Befolgen Sie in diesem Fall die Schritte 1–4, wobei das Röhrchen mit dem 5X COV19-Primergemisch durch das Röhrchen mit dem 5X Kontrollprimergemisch ersetzt wird.

Dieser Test ist optional und kann getrennt für jede Probe durchgeführt werden.

Hinweis! Positivkontrollen (synthetisch RNA-Matrize oder Plasmid) und Negativkontrollen (Wasser ohne genomische DNA oder Nuklease) sollten während der Probenanalyse oder getrennt davon verwendet werden, um die Qualität der Kitbestandteile zu überprüfen. Die Positiv- oder Negativkontrollen sind nicht im Kit enthalten.

B. Zum direkten Nachweis in unverarbeiteten Proben zu befolgen:

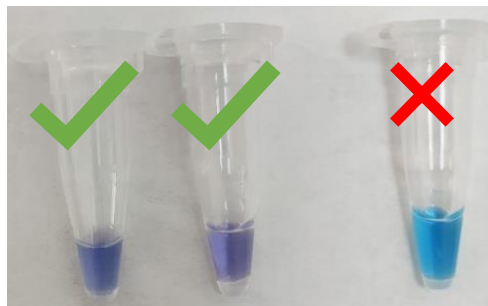
- Pipettieren Sie vor der Vorbereitung des Gemischs das 2X Enzymgemisch und das 5X COV19-Primergemisch intensiv auf und ab.

- Bereiten Sie einen oder mehrere Tests vor, wie in den folgenden Tabelle angegeben, und legen Sie diese auf Eis. Die Vorbereitung von 25 µl zur Nachweis von SARS-CoV-2-RNA in einem 0,2-ml-Röhrchen (nicht im Kit enthalten) wird gemäß den folgenden Anweisungen durchgeführt. Fügen Sie die Reagenzien jedem Röhrchen in der folgenden Reihenfolge hinzu:

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)	Volumen pro 6 Reaktionen (µL)
2X Enzymgemisch	12,5	75
5X COV19/Kontroll-Primergemisch	5	30
Nukleasefreies Wasser	2,5	15
Rohprobe gemischt mit 2X BPX-Puffer	5	5 Stück pro Röhrchen
Gesamtvolumen	25	150

Das Gesamtvolumen pro Reaktion sollte 25 µl betragen.

Hinweis! Die Ausgangsfarbe der 25-µl-qcLAMP-Reaktion sollte violett oder dunkelblau sein (siehe folgende Abbildung – linkes Röhrchen). Wenn die Farbe himmelblau ist (siehe folgende Abbildung – rechtes Röhrchen), führen Sie den Test nicht durch. Zu weiteren Informationen lesen Sie den Abschnitt zu Warn- und Sicherheitshinweisen.



- Fügen Sie vorsichtig 15 µl Mineralöl seitlich in jedes Röhrchen hinzu und warten Sie für ca. 30 s, bis es eine Schicht über der qcLAMP-Reaktion bildet. Vergewissern Sie sich, dass sich das Öl nicht mit dem Reaktionsgemisch mischt.
- Geben Sie die Reaktionen in die Pebble-qcLAMP-Plattform und führen Sie die Tests unter Befolgung der Gebrauchsanweisung für die Pebble-qcLAMP-Plattform durch. Die maximale Anzahl der Proben, die gleichzeitig analysiert werden können, liegt bei 6.

Interpretation der Ergebnisse

Die Pebble-qcLAMP-Plattform nutzt eine Minidigitalkamera zum Überwachen des Übergang zwischen verschiedenen Farbschattierungen während der kolorimetrischen LAMP-Amplifikation in Echtzeit. Die Kamera nimmt unkalibrierte Bilder in vordefinierten Zeitintervallen (10 s) auf und extrahiert automatisch die Werte der Farbkanäle Rot, Grün und Blau (RGB).

Der Farbwechsel wird als Farbindexeinheiten (Pixel) auf der Y-Achse einer Echtzeitkurve angegeben, die auf dem Bildschirm einer intelligenten Vorrichtung angezeigt wird. Es können bis zu 6 (sechs) Kurven gleichzeitig angezeigt werden.

Die Dauer eines Tests beträgt 30 min. Die Auswertung der Ergebnisse sollte durch den Endbenutzer durchgeführt werden (Bitte beachten Sie, dass dieser Test ausschließlich für Fachpersonal vorgesehen ist).

Positive Testergebnisse

Der konkrete Zeitpunkt, zu dem eine Veränderung der Steigung der Echtzeitkurve eintritt (Farbindexeinheiten nehmen zu), entspricht der „Zeit bis zum Eintreten eines positiven Ergebnisses“ (rote durchgängige Linie). Dies ist der Punkt, den der Pfeil zeigt (siehe folgendes Bild).

Wenn eine Probe für ein Ziel positiv ist, verändert sich die Steigung der Kurve zu positiven Werten, wie in Abbildung 1 unten dargestellt.

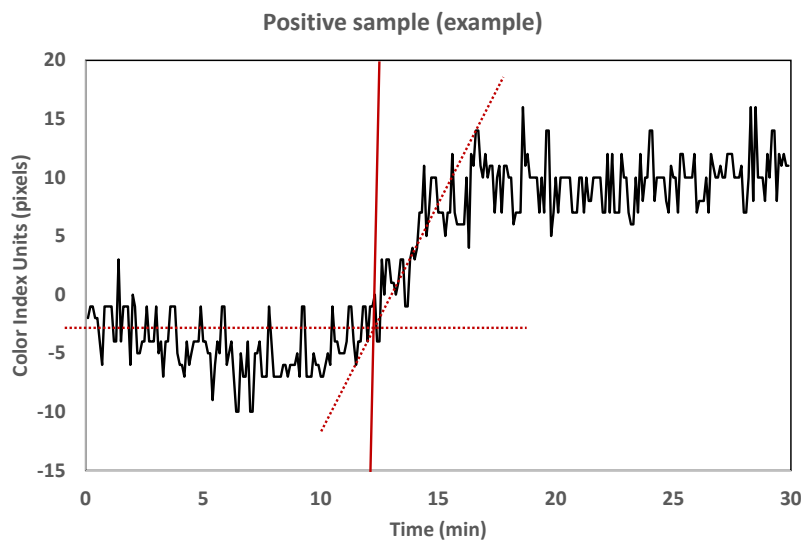


Abbildung 1: Beispiel für positive Ergebnisse von Positivproben A, B.

Negative Testergebnisse

Ein negatives Ergebnis wird durch eine flache Kurve angegeben (Farbindexeinheiten nehmen nicht zu), die über den Überwachungszeitraum hinweg beibehalten wird.

Wenn eine Probe für ein Ziel negativ ist, wird sich die Steigung der Kurve **NICHT VERÄNDERN** (siehe folgende Abbildung).

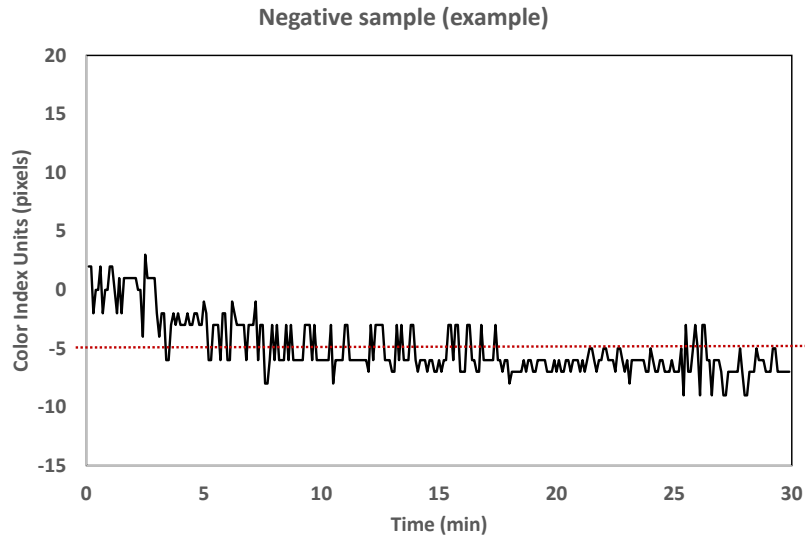


Abbildung 2: Beispiel für ein negatives Ergebnis einer negativen Probe.

Ungültige Testergebnisse

Ein Test wird als ungültig angesehen, wenn eine oder mehrere der folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1. Positive Ergebnisse, die nach **27 Minuten** auftreten, sollten als **falsch-positive Ergebnisse betrachtet werden und als negative Probe gelten**.
2. Treten zwischen **20 und 27 Minuten** positive Ergebnisse auf, wird dringend empfohlen, den **Test zu wiederholen**. Dem Patienten sollte eine neue Probe entnommen (empfohlen nach 2-3 Tagen) werden, und diese sollte getestet werden. Ist eine erneute Probenentnahme nicht möglich, sollte die Vorbereitung der Reaktionen unter Verwendung der ursprünglichen Probe wiederholt werden.
3. Negative Ergebnisse bei Verwendung von extrahierter RNA oder Rohproben direkt mit dem Test und dem 5X-Kontroll-Primergemisch **SIND NICHT** gültig und sollten wiederholt werden. Wenn extrahierte RNA verwendet wird, sollten der RNA-Extraktionsprozess und die Vorbereitung der Reaktionen wiederholt werden. Wird eine Rohprobe direkt zum Test verwendet, sollte dem Patienten eine neue Probe entnommen werden (empfohlen nach 2-3 Tagen) und getestet werden. Ist eine erneute Probenentnahme nicht möglich, sollte die Vorbereitung der Reaktionen unter Verwendung der ursprünglichen Probe wiederholt werden. Für weitere Informationen lesen Sie bitte den Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“.

Beschränkungen des Verfahrens

1. Für zuverlässige Ergebnisse ist es ausschlaggebend, sich an die Gebrauchsanweisung für das COV19-qcLAMP-Kit zu halten. Änderungen im Reaktionsaufbau oder bei der Vorbereitung können zum Versagen der Tests führen.
2. Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung sämtlicher anderen zur Probe erfassten Daten interpretiert werden. Die Interpretation muss durch Personal durchgeführt werden, das für diese Art von Kit geschult und damit vertraut ist.

3. Mutationen innerhalb der Zielsequenz können zu einem Fehler beim Nachweis der Anwesenheit des SARS-CoV-2-Virus führen.
4. Inhibitoren oder andere Arten von Störungen können ein falsch-negatives Ergebnis ergeben. Wenn dies der Fall ist, kann eine andere Probenart oder Isolierungsmethode günstig sein. Störungsuntersuchungen zur Wirkungen gängiger Erkältungsmittel auf die Reaktionen wurden nicht durchgeführt.
5. Dieser Test kann Erkrankungen, die durch andere virale oder bakterielle Erreger verursacht werden, nicht ausschließen.
6. Positive und negative Vorhersagewerte hängen stark von der Prävalenz ab. Falsch-negative Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Inzidenz der Erkrankung hoch ist. Falsch-positive Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Prävalenz der Erkrankung mittel bis niedrig ist.
7. Tests mit dem COV19-qcLAMP-Kit können nur aussagen, ob eine Person derzeit mit diesem speziellen Coronavirus infiziert ist. Es kann keine Informationen zu anderen Erkrankungen oder Symptomen bereitstellen und sagt nicht aus, ob ein Patient zuvor mit dem Virus infiziert gewesen ist oder ob er Immunität gegenüber dem Virus aufweist.
8. Ein falsch-negatives Testergebnis kann auftreten, wenn die Viruslast in einer Probe unter der Nachweisgrenze des Tests liegt oder wenn die Probe unsachgemäß entnommen, gehandhabt oder transportiert wurde.
9. Dieses Kit wurde mit menschlichen Proben validiert.

Leistungseigenschaften

Nachweisgrenze

Um das angegebene Nachweisvermögen des Kits zu beurteilen, wurden drei unabhängige Messungen mit je sechs Replikaten mit 5 µl einer Positivkontrolle durchgeführt, die 50 Kopien/µl bzw. 25 Kopien/µl in H₂O gelöstes Bio-Rad-SARS-CoV-2-Standardreferenzmaterial (Kat.-Nr. COV19) enthielt. Die Beurteilung erfolgte mittels einer Reagenziencharge und eines Geräts.

Beurteilung der Empfindlichkeit, Spezifität und Genauigkeit der Analysen

Eine technische Validierung des COV19-qcLAMP-Kits mit der Pebble-qcLAMP-Point-of-Care-Plattform wurde gemäß EN 13612:2002 durchgeführt.

Die Analyseempfindlichkeit des Kits und insbesondere das Nachweisvermögen wurden unter Befolgung der vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) veröffentlichten Empfehlungen bestimmt.

Es wurden zwei Matrixarten ausgewählt, um Schwankungen zwischen Matrizen zu berücksichtigen – DNase- und RNase-freies Wasser und aus menschlichem Speichel isolierte menschliche RNA. RNA aus dem menschlichen Speichel wurde verwendet, um die Komplexität der Matrix nativer Patientenproben nachzuahmen. Bei der Untersuchung wurden gemäß den CLSI-EP17-A2-Normen vier einzelne, einzigartige und natürliche Patientenproben verwendet. Menschlicher Speichel wurde bei vier gesunden Freiwilligen entnommen und die RNA mit dem Qiagen-RNeasy-Kit (Kat.-Nr. 74192) extrahiert. Isolierte menschliche RNA wurde zusammengeführt, um die repräsentative Matrix zu erzeugen.

Niedrigkonzentrierte Proben wurden durch Versetzen des Bio-Rad-SARS-CoV-2-Standardreferenzmaterials (Kat.-Nr. COV19) mit jeder Matrixart auf eine Endkonzentration von 50 Kopien/µl (LOD) hergestellt.

Der Versuchsaufbau bestand aus Wiederholungsmessungen an Blindproben (NC) und niedrigkonzentrierten Proben (PC) mittels zwei verschiedener Reagenzienchargen, wobei Versuche an mehreren Tagen mit einem einzigen Instrument, aber durch zwei verschiedene Bediener durchgeführt wurden. Der Verarbeitungsplan wurde gemäß den CLSI-EP17-A2-Normen eingerichtet, enthielt sämtliche erforderlichen Auslegungsgrößen und erforderte eine Reihe von Replikaten.

Die Rate von echt-positiven und falsch-positiven Proben, die mit dem COVID-19-qcLAMP-Kit korrekt auf der Pebble-qcLAMP-Plattform erkannt wurden, sollte > 95 % liegen. Die Genauigkeit wurde als Anteil der echt-positiven und falsch-negativen Ergebnisse in allen beurteilten Fällen angegeben.

Ergebnisse der Qualifizierungsmessungen

Auf Grundlage der obigen Daten wurde die Nachweisgrenze (LOD) mit 50 Kopien/µl ermittelt.

				correct		false		% correct		% correct		% correct		% correct
				Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	
Positive	Lot 1	Operator 1	Day 1	6	6	0	0	100	100					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0					
			Day 2	12	11	0	1	100.0	91.7	93.33	96.67		95	
	Lot 2	Operator 1	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 3	6	4	0	2	100.0	66.7					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0	100.00	93.33		96.7	
														95.8
Negative	Lot 1	Operator 1	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	12	12	0	0	100.0	100.0	93.33	100.00		96.7	
	Lot 2	Operator 1	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 3	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0	93.33	100.00		96.7	
														96.7

Die richtig-positive Anzahl betrug 115, die falsch-positive Anzahl betrug 5, die richtig-negative Anzahl betrug 116 und das falsch-negative Verhältnis betrug 4. Auf Grundlage dieser Zahlen wurden die Empfindlichkeit (richtig-positive Rate), die Spezifität (richtig-negative Rate) und die Genauigkeit wie folgt berechnet:

Analyseempfindlichkeit: 0,958 (95,8 %)

Analysespezifität: 0,967 (96,7 %)

Genauigkeit: 0,9625 (96,3 %)

Bewertung der klinischen Sensitivität und Spezifität

Klinische Tests wurden mit insgesamt 1637 nasopharyngealen oder oropharyngealen Proben durchgeführt, die auf COVID-19 untersucht wurden, darunter Proben von symptomatischen oder asymptomatischen Patienten aller Geschlechter und Altersgruppen. Die klinischen Validierungsstudien wurden mit frischen und gefrorenen Proben durchgeführt, wobei versucht wurde, ein Gleichgewicht zwischen niedrigen, mittleren und hohen Viruslasten herzustellen. Die diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität wurden mittels Testung von RT-PCR-Proben als Referenzverfahren und qCLAMP als Textverfahren bestimmt. Vier verschiedene Krankenhäuser nahmen an der klinischen Studie teil: das Allgemeine Universitätsklinikum Heraklion (PAGNI), das University College London Hospital (UCLH), das Nationale Institut für Gesundheit und medizinische Forschung (INSERM) und die Université libre de Bruxelles (ULB).

A. Klinische Tests mit extrahierten RNA-Proben

Extrahierte RNA (gefroren) aus 318 Proben (150 positiv und 168 negativ) wurde mithilfe des COV19-qCLAMP-Kits mit der Pebble-qCLAMP-Point-of-Care-Plattform analysiert. Die positiven Proben wiesen angegebene RT-qPCR-Ct-Werte im Bereich von 12 bis 35 auf. Die kürzeste festgestellte Zeit bis zum Eintreten eines positiven Ergebnisses betrug 10,7 min bei einer Probe mit einem Ct-Wert von 16, während der Höchstwert 26,8 min bei einem Ct von 30 lag.

Gesamtempfindlichkeit: 92 %

Gesamtspezifität: 98,8 %

Genauigkeit: 95,6 %

B. Klinische Tests mit unverarbeiteten Proben (ohne RNA-Extraktion)


Frische und gefrorene unverarbeitete Proben wurden mithilfe des COV19-qCLAMP-Kits mit der Pebble-qCLAMP-Point-of-Care-Plattform analysiert. Die positiven Proben wiesen angegebene RT-qPCR-Ct-Werte im Bereich von 12 bis 31 auf. Die Daten der qualitativen Vergleichsanalyse wurden verwendet, um die diagnostische Sensitivität und Spezifität mit einer Sicherheit von 95 % zu bestimmen.



















Gesamtempfindlichkeit: 80,25 %

Gesamtspezifität: 98,5 %

Genauigkeit: 91,9 %

Verwendete Symbole und Erklärung

Symbole	Erklärung
	Website

	E-Mail
	Telefonnummer
	Verwendung bei der In-vitro-Diagnose
	Chargencode
	Katalognummer
	Siehe elektronische Gebrauchsanweisung
	Hersteller
	Europäische Konformität
	Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden
	Trocken lagern
	Patientennahe IVD
	Nicht zum Selbsttest vorgesehen
	Temperaturgrenze (für Transport)
 100 Teste	Enthält eine ausreichende Menge für 100 Tests
	Seriennummer
	Verfallsdatum
	Eindeutige Geräteerkennung
	Recyclbar

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an BIOPIX-T unter:

Adresse: BIOPIX DNA TECHNOLOGY P.C., Science and Technology Park of Crete, N. Plastira 100, Vasilika Vouton, GR-700 13, Heraklion, Griechenland.

Telefon: (+30) 281 0391986

E-Mail: support@biopix-t.com / info@biopix-t.com

Literaturnachweise

Papadakis et al., „Real-time colorimetric LAMP methodology for quantitative nucleic acids detection at the Point-of-Care“, Nr. 89, S. 1–20, 2020, doi: 10.1101/2020.07.22.215251.

Weltgesundheitsorganisation (WHO), „Coronavirus disease 2019 (2019-nCoV) Situation Report – 11,“ WHO Bull., Nr. 31. Januar, S. 1–7, 2020.

Abkürzungen

Kat.-Nr.: Katalognummer

LAMP: Loop-vermittelte isotherme Amplifikation

qLAMP: Quantitative kolorimetrische Loop-vermittelte isotherme Amplifikation

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

RNA: Ribonukleinsäure

DNA: Desoxyribonukleinsäure

ml: Milliliter

µl: Mikroliter

F