

COV19 qcLAMP kit

CE IVD

REF 000055

GEBRAUCHSANWEISUNG (GAW)

Zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnose

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal

Nicht zum Selbsttest vorgesehen



BIOPIX-T



100 Teste



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 | 7 |
| Probenahme, Handhabung und Vorbereitung vor der Testung..... | 7 |
| Testverfahren..... | 8 |
| Interpretation der Ergebnisse | 10 |
| Beschränkungen des Verfahrens | 12 |
| Leistungseigenschaften..... | 12 |
| Nachweisgrenze | 12 |
| Beurteilung der Empfindlichkeit, Spezifität und Genauigkeit der Analysen..... | 12 |
| Beurteilung der klinischen Empfindlichkeit und Spezifität | 14 |
| Verwendete Symbole und Erklärung | 16 |
| Technischer Support | 17 |
| Literaturnachweise | 17 |
| Abkürzungen | 17 |

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 Testen 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-Testen/Reaktionen**:

Bestandteile des COV19-qcLAMP-Kits

| Bestandteil | Menge | Volumen | Beschreibung |
|---------------------------------|---------------|---------|----------------------------------|
| 2X Enzymgemisch | 1 Röhrchen | 1,25 ml | Farblose Lösung / schwarze Kappe |
| 5X COV19-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 / neutrale 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 COV19-qcLAMP-Kits und infolgedessen zu falschen Ergebnissen führen.

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-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:

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

- 2 Sterilisierte Pipettenfilterspitzen (10 µl, 200 µl und 1000 µl).
- 3 PCR-Röhrchen mit einem maximalen Volumen von 0,2 ml (z. B. Multiply-Pro-PCR-Einzelröhrchen, 0,2 ml von SARSTEDT).
Spezifikationen: Safe-Lock-, Hochprofil-PCR-Miniröhrchen.
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 | 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. |

| | | |
|--|---|--|
| Kontrollprimergemischs ist nicht violett. | | |
| 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. |
| | 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. |
| Reaktionen der Positivkontrollen weisen keine Amplifikation auf. | Die Kitreagenzien waren zu vielen Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt. | Minimieren Sie die Anzahl von Gefrier-Auftau-Zyklen. |
| | 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. |
| | 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. |
| Proben mit extrahierter RNA weisen keine Amplifikation auf. | Der Extraktionsvorgang wurde unsachgemäß durchgeführt. | Verwenden Sie das 5X Kontrollprimergemisch zur Verifizierung des Extraktionsvorgangs. |
| | 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. |
| Unverarbeitete Proben weisen keine Amplifikation auf. | Unverarbeitete Proben enthalten Schleim oder Blut. | Verringern Sie die Viskosität durch 10× oder 100× 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. |
| 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.

Probenahme, Handhabung und Vorbereitung vor der Testung

Es wird empfohlen, sämtliche geöffneten Reaktionsröhrchen baldmöglichst aufzubrechen. 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 Lösungsvermittler.
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 Oropharyngeal-Abstrichproben in einer der folgenden Lösungen löslich gemacht werden:

CITOSWAB® (Virustransportmedium – VTM, 3 ml).

Improviral™ (Viruskonservierungsmittel – VPM, 3 ml).

Liofilchem® (Virustransportmedium – VTM, 3 ml).

Die folgenden Lösungen sind **NICHT** kompatibel:

Biocomma, **MWE** und **LITUO** sollten daher **NIEMALS** in Kombination mit diesem Kit verwendet werden.

Die Probenahme sollten wie folgt ausgeführt werden:

1. Entnehmen Sie Nasopharyngeal- und Oropharyngeal-Abstrichproben in einem Lösungsvermittler.
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.

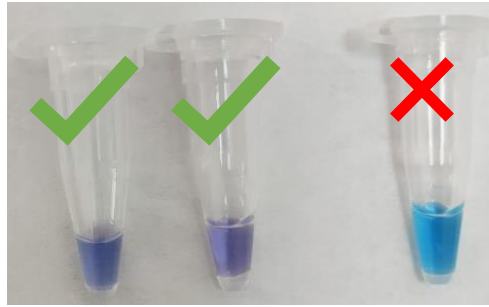
A. Bei Proben mit extrahierter RNA zu befolgen:

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. Fügen Sie die Reagenzien jedem Röhrchen in der folgenden Reihenfolge hinzu:

| Reagens | Volumen pro Reaktion (µl) |
|---------------------------------|---------------------------|
| 2X Enzymgemisch | 12,5 |
| 5X COV19/Kontroll-Primergemisch | 5 |
| Nuklease-freies Wasser | 5,5 |
| Extrahierte RNA | 2 |

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.



3. 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.
4. 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.

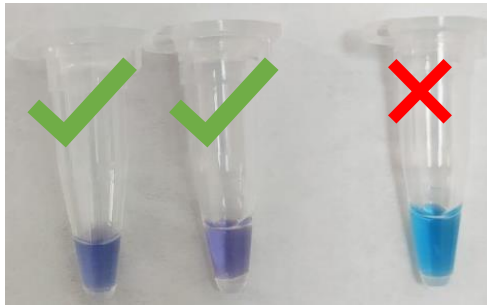
B. Zum direkten Nachweis in unverarbeiteten Proben zu befolgen:

1. Pipettieren Sie vor der Vorbereitung des Gemischs das 2X Enzymgemisch und das 5X COV19-Primergemisch 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. Fügen Sie die Reagenzien jedem Röhrchen in der folgenden Reihenfolge hinzu:

| Reagens | Volumen pro Reaktion (µl) |
|--|---------------------------|
| 2X Enzymgemisch | 12,5 |
| 5X COV19/Kontroll-Primergemisch | 5 |
| Nuklease-freies Wasser | 2,5 |
| Mit 2X BPX-Puffer gemischte unverarbeitete Probe | 5 |

Das Gesamtvolumen pro Reaktion sollte 25 µl betragen.

Hinweis! Die Ausgangsfarbe der 25- μ l-*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.



3. Fügen Sie vorsichtig 15 μ l 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.
4. 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).

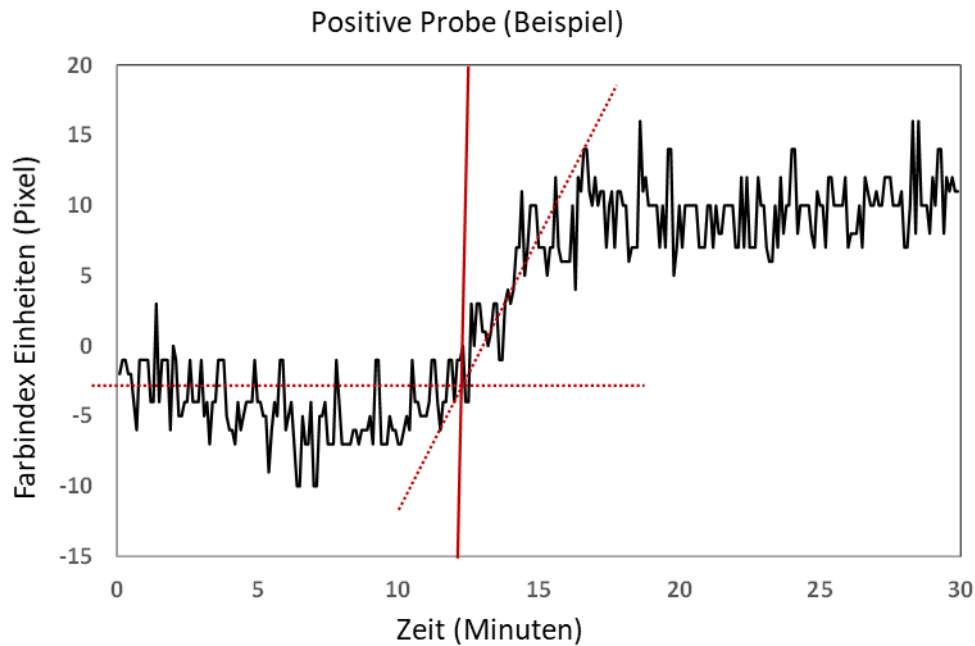
Der Farbwechsel wird als Farbindexeinheiten (Pixel) auf der Y-Achse einer Echtzeitkurve angegeben, die auf dem Bildschirm einer intelligenten Vorrichtung angezeigt wird. Es können bis zu 6 (sechs) Kurven gleichzeitig angezeigt werden.

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, an dem sich die zwei gestrichelten roten Linien kreuzen (siehe folgendes Bild).

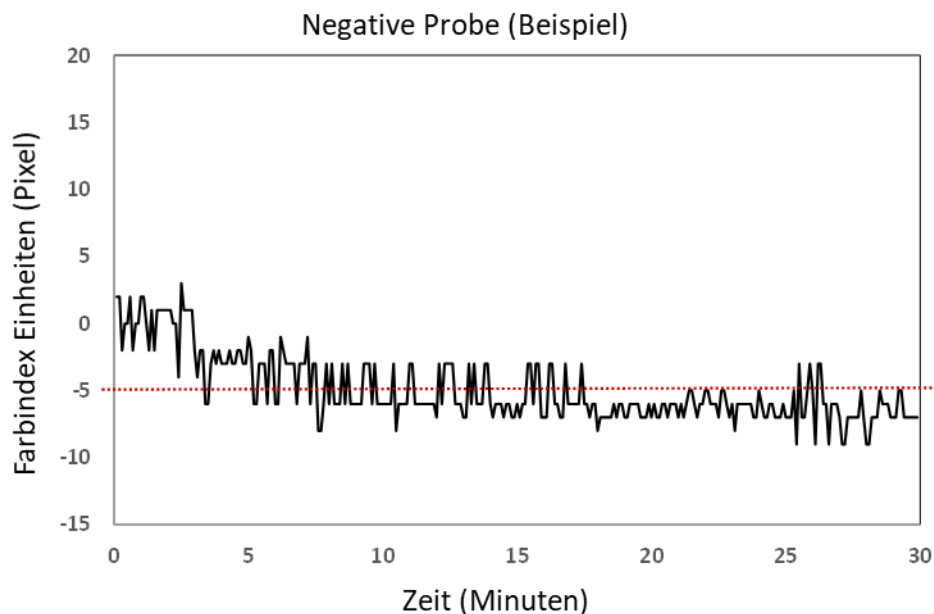
Wenn eine Probe für ein Ziel positiv ist, verändert sich die Steigung der Kurve, wie in der folgenden Abbildung dargestellt.



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).



Ungültige Testergebnisse

Negative Testergebnisse mit extrahierter RNA und dem 5X Kontrollprimergemisch sollten als ungültig angesehen werden. Der RNA-Isolierungsvorgang und die Vorbereitung der Reaktionen sollten wiederholt werden. Zu weiteren Informationen lesen Sie den Abschnitt zu Warn- und Sicherheitshinweisen.

Positive Ergebnisse, die nach **27 Minuten** erscheinen, **SIND NICHT** gültig und sollten wiederholt werden.

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 Teste 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 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. Teste 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 echt-positiven Proben, die mit dem COV19-qcLAMP-Kit korrekt auf der Pebble-qcLAMP-Plattform erkannt wurden, sollte > 95 % liegen. Die Genauigkeit wurde als Anteil der echt-positiven und echt-negativen Ergebnisse in allen beurteilten Fällen angegeben.

Ergebnisse der Qualifizierungsmessungen

Die durchgeführten Messungen und die Interpretation der Daten sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

| Probentyp | Reagenziencharge | Bediener | Messung | Gesammelte Datenpunkte | | | |
|------------------|------------------|------------|---------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| | | | | Positivkontrolle (PC)_H2O_50 | | Positivkontrolle (PC)_H2O_25 | |
| | | | | Richtig | Falsch | Richtig | Falsch |
| Positivkontrolle | Charge 1 | Bediener 1 | 1 | 6 | 0 | 5 | 1 |
| | | | 2 | 6 | 0 | 4 | 2 |
| | | | 3 | 6 | 0 | 4 | 2 |

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

| | | | | correct | | false | | % correct | | % correct | | % correct | | % correct |
|----------|-------|------------|-------|---------|--------|--------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | | | | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | Matrix | |
| | | | | human | H2O | human | H2O | human | H2O | human | H2O | human | H2O | |
| Positive | Lot 1 | Operator 1 | Day 1 | 6 | 6 | 0 | 0 | 100 | 100 | 93.33 | 96.67 | 95 | | |
| | | | 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 | | | | | |
| | 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 | 93.33 | 100.00 | 96.7 | | |
| | | | 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 | | | | | |
| | 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 echt-positive Anzahl betrug 115, die falsch-positive Anzahl betrug 5, die echt-negative Anzahl betrug 116 und das falsch-negative Verhältnis betrug 4. Auf Grundlage dieser Zahlen wurden die Empfindlichkeit (echt-positive Rate), die Spezifität (echt-negative Rate) und die Genauigkeit wie folgt berechnet:

Analyseempfindlichkeit: 0,958 (95,8 %)

Analysespezifität: 0,967 (96,7 %)

Genauigkeit: 0,9625 (96,3 %)

Beurteilung der klinischen Empfindlichkeit und Spezifität

Klinische Tests wurden an insgesamt 645 Nasopharyngeal- oder Oropharyngeal-Abstrichproben durchgeführt, die auf COVID-19 getestet wurden (347 negative und 298 positive Ergebnisse, mit und ohne RNA-Extraktion), darunter auch Proben von symptomatischen oder asymptomatischen Patienten aller Geschlechter und Alterstufen. Die klinischen Validierungsstudien wurde an gefrorenen Proben (gefrorene extrahierte RNA- sowie gefrorene unverarbeitete Proben) vorgenommen, während versucht wurde, die Aufnahme von niedrigen, mittleren und hohen Viruslasten abzustimmen. Die diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität wurden mittels Testung von RT-PCR-Proben als Referenzverfahren und qCLAMP als Textverfahren bestimmt.

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.

Die entsprechenden Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

| Ct-Wert | RT-PCR-positiv | Anteil | qcLAMP | PPA |
|---------|----------------|--------|--------|--------|
| <25 | 69 | 46 % | 69 | 100 % |
| 25–29 | 48 | 32 % | 43 | 91,7 % |
| 30–34 | 33 | 22 % | 24 | 75,8 % |

| qcLAMP-Methode | RT-PCR-Methode | | Insgesamt | |
|----------------|----------------|---------|-----------|--|
| | Positiv | Negativ | | |
| Positiv | 138 | 2 | 140 | |
| Negativ | 12 | 166 | 178 | |
| Insgesamt | 150 | 168 | 318 | |

Gesamtempfindlichkeit: 92 % (95 % CI: 87,7 %–96,3 %)

Gesamtspezifität: 98,8 % (95 % CI: 97,2 %–100 %)

Genauigkeit: 95,6 %

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

326 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 kürzeste festgestellte Zeit bis zum Eintreten eines positiven Ergebnisses betrug 11,5 min bei einer Probe mit einem Ct-Wert von 14, während der Höchstwert 23,8 min bei einem Ct von 26 lag.

Die entsprechenden Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

| Ct-Wert | RT-PCR-positiv | Anteil | qcLAMP | PPA |
|---------|----------------|--------|--------|--------|
| <25 | 104 | 70,7 % | 101 | 97,1 % |
| 25–29 | 36 | 24,5 % | 13 | 36,1 % |
| 30–34 | 7 | 4,8 % | 2 | 28,6 % |










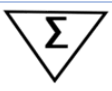


| qcLAMP-Methode | RT-PCR-Methode | | Insgesamt | |
|----------------|----------------|---------|-----------|--|
| | Positiv | Negativ | | |
| Positiv | 125 | 1 | 126 | |
| Negativ | 22 | 178 | 200 | |
| Insgesamt | 147 | 179 | 326 | |

Gesamtempfindlichkeit: 85,0 % (95 % CI: 79,2 %–90,8 %)

Gesamtspezifität: 99,4 % (95 % CI: 98,3 %–100 %)

Genauigkeit: 93 %

Verwendete Symbole und Erklärung

| Symbole | Erklärung |
|---|---|
|  | Website |
| @ | E-Mail |
|  | Telefonnummer |
| IVD | Verwendung bei der In-vitro-Diagnose |
| LOT | Chargencode |
| REF | Katalognummer |
|  | Siehe elektronische Gebrauchsanweisung |
|  | Hersteller |
| CE | 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 Teste |
| SN | Seriennummer |
|  | Verfallsdatum |
| UDI | 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