

Flu A qcLAMP kit

CE IVD



100 Tests

REF

000056

GEBRAUCHSANWEISUNG (IFU)

Für die *In-vitro-Diagnostik*

Nur für den professionellen Einsatz

Nicht für Selbsttests geeignet



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

VORWORT

Hinweis auf die EU IVD-Richtlinie 98/79/EWG

1. Produktkategorie: IVD-Kit
2. Produktname: Flu A qcLAMP-Kit
3. Produktkatalognummer: Kat.Nr. #000056
4. Verwendungszweck: Siehe Abschnitt „Bestimmungsgemäße Verwendung“

Anfragen und Kundenbetreuung (A/S)

Senden Sie uns eine E-Mail (info@biopix-t.com), um Informieren zu diesem Produkt zu erhalten.

Inhalt

Verwendungszweck	3
Beschreibung des Produkts.....	3
Inhalt und Bestandteile des Kits	3
Lagerung und Handhabung.....	4
Haltbarkeitsdauer des Kits	4
Zusätzlich benötigtes, aber nicht mitgeliefertes Material und Ausrüstung	4
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	5
Vorbereitung der Reagenzien	9
Probenentnahme, Handhabung und Vorbereitung vor dem Test.....	9
Testverfahren.....	10
Auswertung der Ergebnisse	13
Einschränkungen der Methode.....	15
Leistungsmerkmale	16
Nachweisgrenze	16
Bewertung der analytischen Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit.....	16
Ergebnisse der Qualifikationsmessungen	17
Bewertung der klinischen Sensitivität und Spezifität	17
Verwendete Symbole und Erklärung	17
Technische Unterstützung	18
Literaturhinweise	18
Abkürzungen	18

Verwendungszweck

Das Flu A qcLAMP-Kit ist ein molekularer *In-vitro-Diagnostest*, der für den Nachweis von Influenza-A-Virus-RNA in Verbindung mit der Pebble qcLAMP Point-of-Care-Plattform bestimmt ist.

Das Flu A qcLAMP-Kit erfordert keine RNA-Extraktion und kann mit nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichproben verwendet werden, die von Personen mit Grippeverdacht entnommen wurden. Das Kit kann auch mit extrahierter RNA verwendet werden.

Die Influenza-A-RNA ist in der Regel in Abstrichproben der oberen Atemwege während der akuten Infektionsphase nachweisbar. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von Influenza-A-RNA hin. Eine klinische Korrelation mit der Krankengeschichte und anderen diagnostischen Informationen ist notwendig, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Positive Ergebnisse schließen eine bakterielle Infektion oder eine Koinfektion mit anderen Viren nicht aus.

Negative Ergebnisse sollten als potenziell negativ betrachtet werden und schließen eine Influenza-A-Infektion nicht aus. Sie sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die Behandlung des Patienten herangezogen werden. Negative Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Krankengeschichte und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.

Das Flu A qcLAMP-Kit ist für die Verwendung durch geschultes Personal oder medizinisches Fachpersonal bestimmt, das mit der Durchführung von Tests auf der qcLAMP-Plattform von Pebble vertraut ist. Es ist nicht für Selbsttests vorgesehen.

Beschreibung des Produkts

Das Flu A qcLAMP-Kit ist ein Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT), das auf der kolorimetrischen Echtzeit-LAMP-Methode (qcLAMP) für den Nachweis des H1N1- und H3N2 Influenza A HA-Gen-RNA-Targets basiert. Das Flu A qcLAMP-Kit erfordert keine RNA-Extraktion und kann direkt mit nasopharyngealen und oropharyngealen Abstrichproben verwendet werden. Alternativ dazu kann das Kit auch mit extrahierter RNA verwendet werden.

Das Kit enthält ein 2X Enzymgemisch, das eine Mischung aus Bst-Polymerase und thermostabiler reverser Transkriptase, optimierten Reaktionspuffer, Mg^{2+} und dNTPs enthält. Es umfasst außerdem ein separates 5X Flu A Primergemisch, die den Influenza A-spezifische Primer und einen Hydroxynaphthol-Blau-Indikator (HNB) enthält, sowie ein 5X Kontroll-Primergemisch zur Amplifikation eines humanen endogenen Ziels (RNase P). Der mitgelieferte 2X BPX-Probenpuffer neutralisiert gängige Probeninhibitoren für die direkte Rohprobenamplifikation und -detektion. Das Kit enthält Mineralöl, das dazu beiträgt, Kreuzkontaminationen zu verhindern und Verdunstung zu minimieren.

Jedes Kit ist ausreichend für 100 Reaktionen. Die Tests werden in der qcLAMP-Plattform von Pebble durchgeführt, die die Reaktionstemperatur und das Timing steuert und die digitale kolorimetrische Echtzeitanalyse der Amplifikationsreaktionen ermöglicht. Die Gesamtdauer des Tests auf der qcLAMP-Plattform von Pebble beträgt **20 Minuten** für die Bewertung eines negativen Ergebnisses. Die Zeit bis zum positiven Ergebnis kann je nach anfänglicher Zielkonzentration zwischen 8 und 20 Minuten betragen.

Inhalt und Bestandteile des Kits

Das Flu A qcLAMP-Kit enthält die folgenden Komponenten zur Durchführung von **100 qcLAMP-Tests/Reaktionen**:

Bestandteile des Flu A qcLAMP-Kits

Komponente	Menge	Volumen	Beschreibung	
2X Enzymgemisch	1 Röhrchen	1,25 ml	Farblose Lösung	Schwarzer Verschluss
5X Flu A Primergemisch	1 Röhrchen	0,5 ml	Violette Lösung	Lila Verschluss
5X Kontroll-Primergemisch	1 Röhrchen	0,25 ml	Violette Lösung	Grüner Verschluss
Nukleasefreies Wasser	1 Röhrchen	1,0 ml	Farblose Lösung	Weißer Deckel
2X BPX-Probenpuffer	6 Röhrchen	1,8 ml	Farblose Lösung	Neutraler Verschluss
Mineralöl	1 Röhrchen	1,8 ml	Farblose Lösung	Blauer Verschluss

Lagerung und Handhabung

Nach der Ankunft sollten die Bestandteile der Kits in der Originalverpackung bei -20°C gelagert werden.

Während der Vorbereitung der Testreaktionen müssen alle Materialien außer Mineralöl auf Eis oder in einem gekühlten Lagerbehälter (0-4°C) aufbewahrt werden. Mineralöl kann bei der Handhabung von Materialien bei Raumtemperatur bleiben.

Unsachgemäßer Umgang mit den Kitkomponenten kann zu einer Verschlechterung des Flu A qcLAMP-Kits und damit zu falschen Ergebnissen führen!

Vor der ersten Verwendung des Flu A qcLAMP-Kits wird empfohlen, einen Teil des anfänglichen Volumens der Reagenzien **2X Enzymgemisch** und **5X Flu A Primergemisch** zu aliquotieren, um das Risiko einer Verschlechterung des Kits durch mehrfache Gefrier-/Auftauzyklen zu verringern.

Vermeiden Sie mehr als 2 Gefrier- und Auftau-Zyklen.

Haltbarkeitsdauer des Kits

Das Kit ist bei 20°C 12 Monate lang stabil.

Zusätzlich benötigtes, aber nicht mitgeliefertes Material und Ausrüstung

Folgende Materialien und Komponenten werden für den Nachweis von Influenza A benötigt und sind nicht im Kit enthalten:

Zur Verwendung mit extrahierter RNA oder Rohproben:

- A. Kits für die Entnahme und den Transport von Proben mit Viren, die die oberen Atemwege befallen
- B. Die Pebble qcLAMP Point-of-Care-Plattform (BIOPIX-T)
- C. Positive (synthetische RNA-Vorlage oder Plasmid) und negative Kontrollen (genomische DNA oder RNase-freies Wasser).
- D. 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, hochprofilierte Mini-PCR-Röhrchen.
 - Abmessungen: Höhe mit Deckel: 21,6 mm-21,7 mm, Außendurchmesser (AD): 5,9 mm-6,1 mm.
- 4 PCR-Gefäße mit einem maximalen Volumen von 1,5 oder 2 ml.
- 5 DNA- und RNA-Abbaulösungen wie DNAZap™, RNAZap™, zehnprozentige Bleiche (1:10-Verdünnung von handelsüblichem 5,25-6,0-prozentigem Natriumhypochlorit) oder gleichwertiges.
- 6 Schutzausrüstung (puderfreie Einweghandschuhe und Laborkittel).

Nur zur Verwendung mit extrahierter RNA:

- E. RNA-Extraktionskits und Werkzeuge für die Extraktion von Gesamt-RNA aus klinischen Proben.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung *in der In-vitro-Diagnostik (IVD)*.
2. Das Flu A qcLAMP-Kit ist nur für den Nachweis von Nukleinsäuren von Influenza A zertifiziert, nicht für andere Viren oder Krankheitserreger.
3. Die Reagenzien sollten in kleinere Volumina aliquotiert werden, wenn sie nicht direkt verwendet werden, um mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen zu vermeiden.
4. Die Probenverarbeitung sollte nach den Richtlinien der Biosicherheitsstufe 2 (BSL-2) oder höher erfolgen.
5. Öffnen Sie die Röhrchen nicht nach dem Ende der qcLAMP-Reaktionen, um eine Kontamination des Bereichs mit DNA-Amplikons zu vermeiden.
6. In Bereichen, in denen Reagenzien vorhanden sind und mit menschlichen Proben umgegangen wird, sollte nicht gegessen, getrunken, geraucht, Kosmetika aufgetragen oder Kontaktlinsen getragen werden.
7. Die Verwendung des Flu A qcLAMP-Kits und die Datenauswertung sind nur geschultem Personal vorbehalten.
8. Verwenden Sie keine Komponenten des Flu A qcLAMP-Kits nach Ablauf ihres Verfallsdatums.
9. Das Flu A qcLAMP-Kit wurde für die Verwendung mit der qcLAMP-Plattform von Pebble optimiert.
10. Prüfen Sie vor der Verarbeitung der Probe die Trübung und Viskosität der Probe. Trübe und zähflüssige Proben können die Reaktion und damit die Ergebnisse beeinflussen. Bei sehr trüben Proben empfehlen wir eine Verdünnung der Abstrichproben im Verhältnis 1:10 oder 1:100, bevor Sie mit dem Test fortfahren. Allerdings wird durch diese Maßnahme auch die Nachweisgrenze (LOD) des Flu A qcLAMP-Tests gesenkt.
11. Entsorgen Sie alle unbenutzten und gebrauchten Reagenzien, Behälter und Humanproben gemäß den bundesstaatlichen, staatlichen und örtlichen Vorschriften.
12. Tragen Sie beim Umgang mit klinischen Proben eine geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Handschuhe, Kittel, Augenschutz).

Die folgenden Warnhinweise sollten bei der Verwendung des Kits beachtet werden:

Warnung	Ursache	Empfehlung
Die anfängliche Farbe des 5X Flu A Primergemisches und des 5X Control Primergemisches ist nicht violett.	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagerung des Kits bei -20°C.
	Die Reagenzien des Kits wurden zu vielen Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen.	Minimieren Sie die Anzahl der Gefrier- und Auftau-Zyklen.
Die anfängliche Farbe der Reaktion ist himmelblau (bevor sie in der qcLAMP-Plattform von Pebble platziert wurde).	Die Reaktion wurde nicht richtig vorbereitet.	Achten Sie auf das richtige Mischen der Reagenzien und die Genauigkeit der pipettierten Volumina. Mischen Sie die Komponenten 2X Enzymgemisch, 5X Flu A 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.	Lagerung des Kits bei -20°C.
	Kit nach Ablauf des Verfallsdatums verwendet.	Vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
	Die Reagenzien des Kits wurden zu vielen Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen.	Minimieren Sie die Anzahl der Gefrier- und Auftau-Zyklen.
Positive Kontrollreaktionen zeigen keine Amplifikation.	Die Reagenzien des Kits wurden zu vielen Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen.	Minimieren Sie die Anzahl der Gefrier- und Auftau-Zyklen.
	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagerung des Kits bei -20°C.
	Kit nach Ablauf des Verfallsdatums verwendet.	Vor Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
	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 Flu A 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 die Probe in der Reaktion zugegeben wird.
	Die positive RNA-Kontrolle wurde abgebaut.	Vermeiden Sie mehrfache Gefrier- und Auftau-Zyklen und aliquotieren Sie die Reagenzien entsprechend.
	Durch RNasen kontaminierte Kit-Reagenzien.	Verwenden Sie Lösungen (z. B. Ethanol, Chlorlösung, Reinigungsmittel) zur Reinigung der Oberflächen und der Geräte. Schutzausrüstung verwenden. Ersetzen Sie die Reagenzienbestände durch neue Materialien.
RNA-extrahierte Proben weisen keine Amplifikation auf.	Der Extraktionsprozess wurde nicht ordnungsgemäß durchgeführt.	Verwenden Sie das 5X-Kontroll-Primergemisch zur Überprüfung des Extraktionsprozesses. Wenn es keine Amplifikation zeigt, wiederholen Sie den Extraktionsprozess
	Die Viruslast liegt unter der Nachweisgrenze.	Negative Ergebnisse schließen eine Influenza-A-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die Behandlung des Patienten verwendet werden. Die Probenahme und Untersuchung sollte mindestens nach 24 Stunden 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 Flu A 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.
Rohproben weisen keine Amplifikation auf.	Rohproben enthalten Schleim oder Blut.	Verringern Sie die Viskosität, indem Sie die Abstrichproben 10- oder 100-fach verdünnen, bevor Sie fortfahren, oder nehmen Sie die Abstrichprobe erneut.
	Die Viruslast liegt unter der Nachweisgrenze.	Negative Ergebnisse schließen eine Influenza-A-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die Behandlung des Patienten verwendet werden. Die Probenahme und Untersuchung sollte mindestens nach 24 Stunden 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 Flu A 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 zeigen eine Amplifikation.	Kontamination der Probe mit RNA.	Öffnen Sie die Reaktionsgefäße niemals nach der Amplifikation. Verwenden Sie nur Röhrchen mit sicheren Deckeln, die noch nicht benutzt wurden. Verwenden Sie zum Reinigen des Arbeitsraums und der Ausrüstung eine Lösung zum Abbau von DNA oder eine zehnprozentige Chlorbleiche.

		Ersetzen Sie die Reagenzienbestände durch neue Materialien. Wechseln Sie die Pipettenspitzen zwischen den Proben.
	Unsachgemäße Lagerung des Kits.	Lagerung des Kits bei -20°C.
	Die Reagenzien des Kits wurden zu vielen Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen.	Minimieren Sie die Anzahl der Gefrier- und Auftau-Zyklen.
	Amplifikation ohne Vorlage.	Alle Reaktionen sollten vor der Amplifikation angesetzt und auf Eis gelegt werden. Führen Sie die qCLAMP-Reaktionen sofort nach der Vorbereitung durch.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sind fertig gemischt und können ohne vorherige Vorbereitung verwendet werden. Vor der ersten Verwendung des Flu A qCLAMP-Kits wird empfohlen, einen Teil des anfänglichen Volumens der Reagenzien **2X Enzymgemisch** und **5X Flu A Primergemisch** zu aliquotieren, um das Risiko einer Verschlechterung des Kits durch mehrfache Gefrier-/Auftauzyklen zu verringern.

Vermeiden Sie mehr als 2 Gefrier- und Auftau-Zyklen.

Probenentnahme, Handhabung und Vorbereitung vor dem Test

Es wird empfohlen, alle geöffneten Reaktionsgefäße so bald wie möglich zu verwenden. Verwenden Sie die Bestandteile des Kits vor Ablauf des Verfallsdatums entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Es ist sehr wichtig, Werkzeuge und Reagenzien zu verwenden, die frei von RNasen sind. Darüber hinaus wird empfohlen, alle Präparationsschritte in nukleasenfreien Bereichen durchzuführen und nur Pipetten mit Filterspitzen zu verwenden.

Zu befolgen für Tests mit extrahierter RNA:

Verfahren zur Probenahme:

1. Sammeln Sie nasopharyngeale und oropharyngeale Abstrichproben in einer beliebigen Solubilisierungslösung.
2. Entnehmen Sie 200 µl der gesammelten Probe und führen Sie eine RNA-Extraktion durch. Eluieren Sie die extrahierte RNA in 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser und stellen Sie sie sofort auf Eis oder lagern Sie sie bei -20°C.

Zu befolgen bei der Prüfung mit einer Rohprobe:

Um einen Test ohne RNA-Extraktion durchzuführen, sollten spezifische nasopharyngeale und/oder oropharyngeale Abstrichproben in spezifischen viralen Transportmedienlösungen (VTM) aufgelöst werden. Nur **KOMPATIBLE** virale Transportmedien **können** in Kombination mit dem Flu A qCLAMP-Kit

verwendet werden (Tabelle 1). Ein **nicht** kompatibles virales Transportmedium **NIEMALS** in Kombination mit dem Flu A 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 sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. Sammeln Sie nasopharyngeale und oropharyngeale Abstrichproben in einer lösenden Lösung.
2. 100 µl der gesammelten Probe abnehmen und mit 100 µl 2X BPX-Probenpufferlösung gut mischen. Sofort verwenden.

Testverfahren

Die Proben **müssen** vor dem Testverfahren vorbereitet werden. Bewahren Sie die vorbereiteten Proben bis zur Verwendung auf Eis auf.

Bewahren Sie die Röhrchen des Flu A qcLAMP-Kits (2X Enzymgemisch, 5X Flu A Primergemisch, 5X Kontroll-Primergemisch, nukleasefreies Wasser) und die Reaktionen während der Vorbereitung auf Eis oder in einer Eisbox auf. Das Mineralöl konnte während der Vorbereitung der Tests bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

A. Zu verfolgen mit extrahierten RNA-Proben:

1. Pipettieren Sie vor der Herstellung einer Mischung die Lösung des 2X-Enzymgemisches und die Lösung des 5X-Flu-A-Primergemisches **intensiv** auf und ab.
2. Bereiten Sie einen oder mehrere Tests wie in der folgenden Tabelle angegeben vor und legen Sie sie auf Eis. Die Zubereitung von 25 µl für den Nachweis von Influenza-A-RNA in einem 0,2-ml-Röhrchen (nicht im Kit enthalten) erfolgt gemäß den folgenden Anweisungen. Für die Vorbereitung von 6 Proben ist es besser, eine Mastermischung vorzubereiten. Vor der Zugabe der

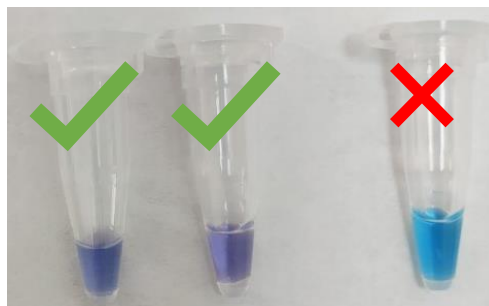
2 µl extrahierter RNA aliquotieren Sie die Mischung in 6 verschiedene Rörchchen mit einem Gesamtvolumen von 23 µl in jedem von ihnen. Geben Sie dann 2 µl der extrahierten RNA aus jeder Probe in ein anderes Rörchchen. Geben Sie die Reagenzien in der folgenden Reihenfolge in jedes Rörchchen (Tabelle 3).

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 Flu A oder Kontroll-Primergemisch	5	30
Nukleasefreies Wasser	5.5	33
Extrahierte RNA	2	2 in jedem Rörchchen
Gesamtvolumen	25	150

Das Gesamtvolumen für eine Reaktion sollte 25 µl betragen.

Hinweis! Die anfängliche Farbe der 25 µL qcLAMP-Reaktion sollte lila oder tiefblau sein (siehe Abbildung unten – linkes Rörchchen). Wenn die Farbe himmelblau ist (siehe Abbildung unten – rechtes Rörchchen), führen Sie den Test nicht durch. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“.



- Geben Sie vorsichtig **15 µl** Mineralöl an der Seite jedes Rörchchens hinzu und warten Sie etwa 30 Sekunden, bis sich eine Schicht über der qcLAMP-Reaktion bildet. Achten Sie darauf, dass das Öl nicht mit der Reaktion vermischt wird.
- Legen Sie die Reaktionen in die qcLAMP-Plattform von Pebble und führen Sie die Tests gemäß der Gebrauchsanweisung der qcLAMP-Plattform von Pebble durch. Die maximale Anzahl von Proben, die gleichzeitig analysiert werden können, beträgt 6.

Zur Überprüfung einer ordnungsgemäß durchgeführten RNA-Extraktion kann das obige Verfahren für den Nachweis eines humanen endogenen Ziels (interne Kontrolle, IC), des RNase-P-Gens, wiederholt werden, indem das 5X-Flu-A-Primergemisch durch das 5X-Kontroll-Primergemisch ersetzt wird. Verwenden Sie zur Durchführung dieses Tests die 5X-Kontroll-Primer-Mischlösung. Führen Sie in diesem Fall die Schritte 1-4 aus und ersetzen Sie das 5X Flu A Primer-Mischrörchchen durch das 5X Control Primer-Mischrörchchen (Tabelle 3). Dieser Test ist fakultativ und kann für jede Probe einzeln durchgeführt werden.

Hinweis! Positiv- (synthetische RNA-Vorlage oder Plasmid) und Negativkontrollen (genomische DNA oder Nukleasefreies Wasser) sollten während der Analyse der Probe oder separat verwendet werden, um die Qualität der Kitbestandteile zu überprüfen. Positiv- oder Negativkontrollen sind nicht im Kit enthalten.

B. Zu befolgen bei direktem Nachweis von Rohproben:

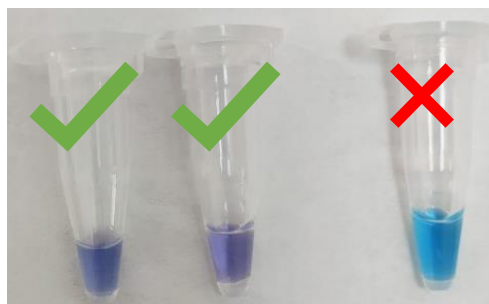
1. Pipettieren Sie vor der Herstellung einer Mischung das 2X-Enzymgemisch und das 5X-Flu-A-Primergemisch **intensiv** auf und ab.
2. Bereiten Sie einen oder mehrere Tests wie in der folgenden Tabelle angegeben vor und legen Sie sie auf Eis. Die Zubereitung von 25 µl für den Nachweis von Influenza-A-RNA in einem 0,2-ml-Röhrchen (nicht im Kit enthalten) erfolgt gemäß den folgenden Anweisungen. Für die Vorbereitung von 6 Proben ist es besser, eine Mastermischung vorzubereiten. Vor der Zugabe der 5 µl der mit 2X BPX-Puffer gemischten Rohprobe aliquotieren Sie die Mischung in 6 verschiedene Röhrchen mit einem Gesamtvolumen von 20 µl in jedem von ihnen. Anschließend werden 5 µl der mit 2X BPX-Puffer gemischten Rohprobe aus jeder Probe in jedes andere Röhrchen gegeben. Geben Sie die Reagenzien in der folgenden Reihenfolge in jedes Röhrchen (Tabelle 4):

Tabelle 4: Einrichten der Probe(n) unter Verwendung der Rohprobe

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)	Volumen pro 6 Reaktionen (µL)
2X Enzymgemisch	12,5	75
5X Flu A oder 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 für eine Reaktion sollte 25 µl betragen.

Hinweis! Die anfängliche Farbe der 25 µL qcLAMP-Reaktion sollte lila oder tiefblau sein (siehe Abbildung unten – linkes Röhrchen). Wenn die Farbe himmelblau ist (siehe Abbildung unten – rechtes Röhrchen), führen Sie den Test nicht durch. Für weitere Informationen lesen Sie bitte den Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“.



3. Geben Sie vorsichtig 15 µl Mineralöl an der Seite jedes Röhrchens hinzu und warten Sie etwa 30 Sekunden, bis sich eine Schicht über der qcLAMP-Reaktion bildet. Achten Sie darauf, dass das Öl nicht mit dem Reaktionsgemisch vermischt wird.

4. Legen Sie die Reaktionen in die qcLAMP-Plattform von Pebble und führen Sie die Tests gemäß der Gebrauchsanweisung der qcLAMP-Plattform von Pebble durch. Die maximale Anzahl von Proben, die gleichzeitig analysiert werden können, beträgt 6.

Auswertung der Ergebnisse

Die qcLAMP-Plattform von Pebble verwendet eine Mini-Digitalkamera, um den Übergang zwischen verschiedenen Farbschattierungen während der kolorimetrischen LAMP-Verstärkung in Echtzeit zu überwachen. Die Kamera nimmt in vordefinierten Zeitintervallen (10 Sekunden) nicht kalibrierte Bilder auf und extrahiert automatisch die Werte des roten, grünen und blauen (RGB-)Kanals.

Die Farbänderung wird als Farbindexeinheiten (Pixel) auf der Y-Achse einer Echtzeitkurve ausgedrückt, die auf dem Bildschirm eines Smart-Geräts angezeigt wird. Es können bis zu 6 (sechs) Kurven gleichzeitig angezeigt werden.

Die Dauer eines Tests beträgt 30 Minuten. Die Auswertung der Ergebnisse sollte vom Endbenutzer vorgenommen werden (bitte beachten Sie, dass es sich um einen Test für den professionellen Gebrauch handelt).

Positive Testergebnisse

Der spezifische Zeitpunkt, an dem eine Änderung der Steigung der Echtzeitkurve eintritt (Anstieg der Farbindexeinheiten), entspricht dem „Time-to-Positive“-Ergebnis (rote Linie). Dies ist der Punkt, auf den der Pfeil zeigt.

Wenn eine Probe für ein beliebiges Target positiv ist, **ändert sich** die Steigung der Kurve zu positiven Werten, wie in Abbildung 1 unten dargestellt.

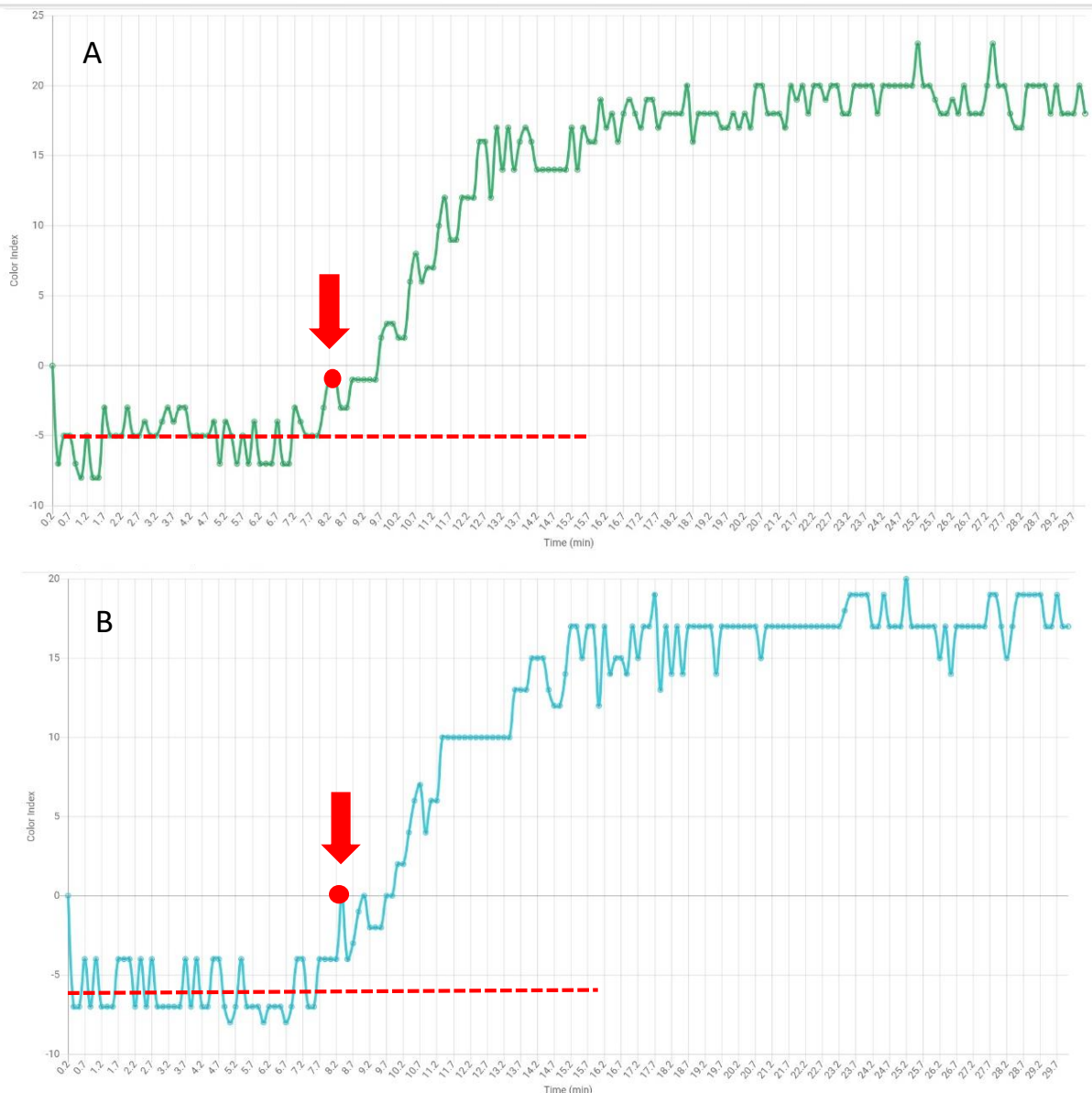


Abbildung 1: Beispiel für positive Ergebnisse von Positivproben A, B.

Negative Testergebnisse

Ein negatives Ergebnis wird durch eine flache Kurve (Farbindexeinheiten steigen nicht an) angezeigt, die während des gesamten Überwachungszeitraums beibehalten wird.

Ist eine Probe für ein beliebiges Target negativ, wird sich die Steigung der Kurve **NICHT VERÄNDERN** (siehe Abbildung 2 unten).

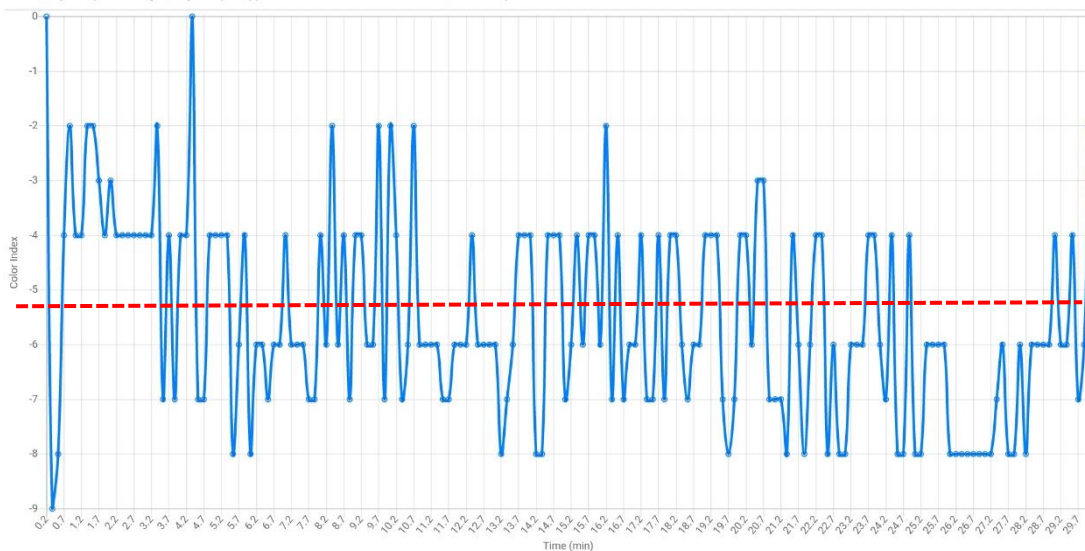


Abbildung 2: Beispiel für ein negatives Ergebnis einer negativen Probe.

Ungültige Testergebnisse

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

1. Positive Ergebnisse, die nach **20 Minuten** auftreten, sollten als **falsch-positive Ergebnisse** betrachtet werden und als negative Probe gelten.
2. 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-Isolierungsprozess 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“.

Einschränkungen der Methode

1. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, die Gebrauchsanweisung des Flu A qCLAMP-Kits zu befolgen. Änderungen des Reaktionsaufbaus oder der Zubereitung können zum Scheitern der Tests führen.
2. Die Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit allen anderen für die Stichprobe erhobenen Daten interpretiert werden. Die Auswertung muss von Personal vorgenommen werden, das im Umgang mit dieser Art von Ausrüstung geschult und erfahren ist.
3. Mutationen innerhalb der Zielsequenz können dazu führen, dass das Virus Influenza A nicht erkannt wird.
4. Inhibitoren oder andere Arten von Störungen können zu einem falsch-negativen Ergebnis führen. Ist dies der Fall, kann eine andere Probenart oder eine andere Isolierungsmethode von Vorteil

sein. Interferenzstudien über die Auswirkungen gängiger Medikamente auf Erkältungen, auf Reaktionen, wurden nicht durchgeführt.

5. Dieser Test kann Krankheiten, die durch andere virale oder bakterielle Erreger verursacht werden, nicht ausschließen.
6. Die positiven und negativen prädiktiven Werte hängen stark von der Prävalenz ab. Falsch-negative Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Inzidenz der Krankheit hoch ist. Falsch-positive Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Prävalenz der Krankheit mäßig bis gering ist.
7. Tests mit dem Flu A qcLAMP-Kit können nur feststellen, ob eine Person derzeit mit diesem speziellen Virus infiziert ist. Er kann keine Informationen über andere Krankheiten oder Symptome liefern und sagt nichts darüber aus, ob ein Patient zuvor mit dem Virus infiziert war oder ob er eine Immunität gegen das Virus besitzt.
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, behandelt oder transportiert wurde.

Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze

Um die LOD des Kits zu bewerten, wurde eine LOG₁₀-Verdünnungsreihe einer in H₂O gelösten Influenza A-Plasmid-DNA gemessen. Die Bewertung wurde mit einer Reagenziencharge und einem Gerät durchgeführt.

Bewertung der analytischen Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit

Mit nukleasefreiem Wasser und humaner genomischer DNA wurde eine Matrix für die zu untersuchenden Proben erstellt, die mit der Probe eines echten Patienten identisch ist.

Für die interne Bewertung der Leistung des Flu-A-Kits wurden synthetische DNA-Sequenzen des HA-Gens von Influenza A H1N1 und H3N2 verwendet. Die synthetischen DNA-Sequenzen wurden rekonstituiert, was zu zwei ursprünglichen Vorlagen führte. Anschließend wurden serielle Verdünnungen durchgeführt, um positive Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zielgens zu erzeugen.

Die Blindproben bestanden aus nukleasefreiem Wasser und humaner genomischer DNA, um sicherzustellen, dass es keine unspezifischen Wechselwirkungen gibt.

Low-Level-Proben wurden durch Aufstocken der Influenza-A-DNA auf jeden Matrixtyp vorbereitet, um eine Endkonzentration von 60 Kopien der Messgröße/μl zu erreichen. Geringfügige Proben wurden aliquotiert, um ausreichende Mengen für die Messung zu enthalten. Die aliquotierten Proben wurden vor der Verwendung eingefroren.

Der Versuchsplan besteht aus Wiederholungsmessungen an Leerwert- (NC) und Niedrigwertproben (PC), wobei die Versuche an mehreren Tagen mit einem einzigen Gerät durchgeführt werden.

Die Genauigkeit wurde als der Anteil der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse in allen bewerteten Fällen angegeben.

Ergebnisse der Qualifikationsmessungen

Auf der Grundlage der oben genannten Daten wurde die Nachweisgrenze (LOD) auf 60 Kopien/ μ L festgelegt.

Die Leistungsbewertung des Flu A qcLAMP-Kits wurde anhand von 80 gesammelten Datenpunkten durchgeführt. Der richtige positive Wert ist 45, der falsche positive Wert ist 0, der richtige negative Wert ist 22 und der falsche negative Wert ist 3. Unter Berücksichtigung dieser Zahlen wurden Sensitivität (wahrer positiver Anteil), Spezifität (wahrer negativer Anteil) und Genauigkeit berechnet und im Folgenden zusammengefasst:

Analytische Sensitivität: 97,5 %













Analytische Spezifität: 100 %








Genauigkeit: 98,7%

Bewertung der klinischen Sensitivität und Spezifität

Klinische Tests wurden nicht durchgeführt.

Verwendete Symbole und Erklärung

Symbole	Erläuterung
	Website
	E-Mail
	Rufnummer
	Verwendung <i>in der In-vitro-Diagnostik</i>
	Chargennummer
	Katalognummer
	Elektronische Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	EU-Konformität
	Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Trocken halten
	IVD in Patientennähe

	Nicht für Selbsttests geeignet
	Temperaturgrenze (für den Transport)
 100 Test	Enthält eine ausreichende Menge für 100 Tests
	Seriennummer
	Nutzung pro Tag
	Eindeutige Kennung des Geräts
	Wiederverwertbar

Technische Unterstützung

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an BIOPIX-T:

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

Literaturhinweise

Papadakis et al., „Portable real-time colorimetric LAMP-device for rapid quantitative detection of nucleic acids in crude samples“, Scientific Reports volume 12, Art.Nr. 3775 (2022).

Abkürzungen

Kat.-Nr: Katalognummer

LAMP: Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation

qLAMP: Quantitative kolorimetrische Schleifen-vermittelte isothermische Amplifikation

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

RNA: Ribonukleinsäure

DNA: Desoxyribonukleinsäure

ml: Milliliter

µL: Mikroliter