



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC Handels GmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

RIDA® GENE Flu & SARS-CoV-2

REF PG6825



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch	3
English.....	19
Español.....	35
Français.....	51
Italiano	69
Português	85

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF PG6825

1. Zweckbestimmung

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

Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test ist zur Unterstützung der Differentialdiagnose von Flu A/Flu B und SARS-CoV-2-Infektionen bei Patienten mit Symptomen einer respiratorischen Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Flu A/Flu B oder SARS-Cov-2 nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden. Das Produkt ist für den Einsatz durch Fachanwender in Krankenhauslaboren, Referenzlaboren, Privatlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Ende Dezember 2019 traten in Wuhan, einer Metropole Chinas, eine Vielzahl von Lungenentzündungen mit unklarer Ursache auf.¹ Anfang Januar 2020 konnte von chinesischen Behörden ein neuartiges Coronavirus (SARS-CoV-2) als Ursache dieser Erkrankungen identifiziert werden.¹ Die durch SARS-CoV-2 ausgelöste Krankheit erhielt den offiziellen Namen COVID-19 („Corona Virus disease 2019“) und ist von Mensch zu Mensch übertragbar.² Da es sich um einen neuen Erreger handelt kam es rasch von der Entwicklung einer Epidemie zu einer Pandemie.

Weltweit wurden bereits 66.422.058 Fälle gemeldet (Stand: 08.12.2020).³ Erste Fälle sind seit Ende Januar 2020 auch in Deutschland bestätigt worden. Deutschlandweit wurden bereits 1.197.709 Fälle gemeldet (Stand: 08.12.2020).⁴ Die WHO hat am 31.01.2020 einen internationalen Gesundheitsnotstand ausgerufen.¹

SARS-CoV-2 & Influenza-Viren weisen einige Gemeinsamkeiten auf. So ist bei beiden Erregern der Hauptübertragungsweg die respiratorische Aufnahme virushaltiger Flüssigkeitspartikel, die beim Atmen, Husten, Sprechen und Niesen entstehen.^{5,6} Die Symptome im frühen Stadium sind typisch für virologische

Atemwegserreger. Zu den häufigsten erfassten Symptomen zählen bei beiden Erregern Fieber, Husten & Schnupfen. Da die Krankheitsverläufe bei SARS-CoV-2 in ihrer Symptomatik und Schwere stark variieren (symptomlos bis zu schwerer Pneumonie mit Lungenversagen und Tod) ist eine Differenzierung von SARS-CoV-2 & Influenza Viren für die weitere Therapie wichtig.

3. Testprinzip

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 ist ein multiplex real-time RT-PCR Test zum direkten qualitativen Nachweis und Differenzierung der Flu A/Flu B und der Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA aus humanen Nasen-/Rachenabstrichen. Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR-Format, d.h. die Reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Genfragmente für Influenza A (M-Gen), Influenza B (NP1-Gen) und SARS-CoV-2 (E-Gen; RdRp-Gen) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 200 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	<u>Reaction Mix</u>	4x	1050 µl	gelb
2	<u>Enzyme Mix</u>	1x	160 µl	rot
R	<u>Internal Control RNA</u>	4x	1700 µl	braun
N	<u>No Template Control</u>	1x	450 µl	weiß
P	<u>Positive Control</u>	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 – 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 – 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR Test wurde mit folgender Extraktionsplattform und real-time PCR-Gerät Kombination verifiziert:

Tab.2a: Benötigtes Zubehör (verifiziert)

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

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

Tab. 2b: Benötigtes Zubehör (kompatibel)

Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer

- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf der R-Biopharm Homepage.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben

Für die RNA-Präparation aus humanen respiratorischen Proben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test enthält eine Internal Control RNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control RNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control RNA** je Probe während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen, je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 – 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl No Template Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie und RIDA®CYCLER

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q und CFX96™ Dx

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA-Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR-Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

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

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

**¹ Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind valide, wenn sie den in der Tabelle angegebenen Bedingungen entsprechen. Der Ct-Bereich für die Positivkontrolle ist auf dem Produkt beigelegten Quality Assurance Certificate angegeben. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht die Bedingungen für einen validen Lauf erfüllen, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

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

* schwache Kreuzreaktivität zu SARS-CoV-1 möglich

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

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

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

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

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

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

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

12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für humane Nasen-/Rachenabstriche geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
5. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene für Influenza A (M-Gen), Influenza B (NP1-Gen) und SARS-CoV-2 (E-Gen; RdRp-Gen) vorhanden sind.
6. Das Vorhandensein von RT-PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Die Auswirkungen von Impfstoffen, antiviralen Therapeutika, Antibiotika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva zur Vorbeugung von COVID-19 oder zur Behandlung der Infektion oder andere interferierende Substanzen wurden nicht untersucht.
7. Dieser Assay sollte gemäß der GLP-Verordnung (Good Laboratory Practice) durchgeführt werden. Der Anwender muss bei der Durchführung des Tests die Anweisungen des Herstellers genau befolgen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Präzision

Die Präzision des RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR Tests wurde für folgende Betrachtungsebenen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben mit je 20 Replikaten auf dem LightCycler® 480II unter identischen Bedingungen.

Inter-Assay Präzision: Bestimmung von 5 Kontrollproben in Duplikaten an 10 Arbeitstagen von unterschiedlichen Operatoren unter reproduzierbaren Bedingungen.

Inter-Lot Präzision: Die Testungen zur Intra- und Inter-Assay Präzision erfolgten mit drei unterschiedlichen Lots.

Die erhaltenen Variationskoeffizienten der jeweiligen Messungen mit dem RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR Test auf dem LightCycler® 480II lagen unter 2,5 %.

13.2 Analytische Sensitivität

13.2.1 Gerätenachweisgrenze

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

Die Gerätenachweisgrenze liegt somit bei 50 Kopien/Reaktion.

13.3 Analytische Spezifität

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

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

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

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

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

13.4 Analytische Reaktivität

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

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung

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

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

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-12-08	Freigabeversion

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

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

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Zugriff am 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Zugriff am 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/> Zugriff am 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Zugriff am 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Zugriff am 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756 Zugriff am 16.09.2020

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF**PG6825**

1. Intended use

For in vitro diagnostic use. The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 test, performed on the LightCycler® 480II real-time PCR instrument, is a multiplex real-time RT-PCR for the direct qualitative detection and differentiation of flu A/flu B and coronavirus (SARS-CoV-2) RNA in human nasal/throat swabs from persons with signs and symptoms of respiratory infection.

The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 test is intended to support the differential diagnosis of flu A/flu B and SARS-CoV-2 infections in patients with symptoms of respiratory infection in connection with other clinical and laboratory findings.

Negative results do not rule out infection with flu A/flu B or SARS-CoV-2 and should not be used as the sole basis for diagnosis. The product is intended for use by professionals working in hospital laboratories, reference laboratories, private laboratories, or public laboratories.

2. Summary and explanation of the test

At the end of December 2019 in the Chinese metropolis of Wuhan, numerous cases of pneumonia of unknown cause occurred.¹ At the beginning of January 2020, Chinese authorities identified a novel coronavirus (SARS-CoV-2) as the cause of these illnesses.¹ The disease caused by SARS-CoV-2 was officially named COVID-19 ("coronavirus disease 2019") and is transmitted from human to human.² Due to this pathogen's novelty, the epidemic rapidly evolved into a pandemic.

There have already been 66,422,058 cases recorded worldwide (as of 08-Dec-20).³ At the end of January 2020, the first cases were confirmed in Germany as well. Germany has had 1,197,709 cases so far (as of 08-Dec-20).⁴ The WHO declared a Public Health Emergency of International Concern on 2020-01-31.¹

SARS-CoV-2 and influenza viruses share some similarities. For instance, the primary route of transmission for both of these pathogens is the airborne route through virus-laden respiratory droplets generated by breathing, coughing, talking, and sneezing.^{5,6} The symptoms in the early stage are typical for respiratory viral pathogens. The most commonly reported symptoms for both pathogens are fever, cough, and nasal congestion. Since SARS-CoV-2 disease courses can vary greatly

in symptoms and severity (from asymptomatic to severe pneumonia with lung failure and death), the differentiation of SARS-CoV-2 and influenza viruses is important for further therapy.

3. Test principle

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 is a multiplex real-time RT-PCR test for the direct qualitative detection and differentiation of flu A/flu B and coronavirus (SARS-CoV-2) RNA in human nasal/throat swabs.

Detection is done in a one-step real-time RT-PCR format: reverse transcription (RT) and subsequent PCR take place in one reaction vial. In the process, the isolated RNA is transcribed into cDNA with the help of a reverse transcriptase. Next, real-time PCR is used to amplify the gene fragments for influenza A (M gene), influenza B (NP1 gene), and SARS-CoV-2 (E gene and RdRp gene). The amplified target sequences are detected using hydrolysis probes that are labeled with a quencher at one end and a fluorescent reporter dye (fluorophore) at the other. The probes hybridize to the amplicon in the presence of a target sequence. During extension, Taq-Polymerase separates the reporter from the quencher. The reporter emits a fluorescent signal that is detected by the optical unit of a real-time PCR device. The fluorescent signal increases with the quantity of formed amplicons. The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 test contains an Internal Control RNA (ICR) to be able to control sample preparation and/or potential PCR inhibition.

4. Reagents provided

Table 1: Reagents provided (The reagents provided in the kit are sufficient for 200 determinations.)

Kit code	Reagent	Amount		Lid color
1	<u>Reaction Mix</u>	4x	1050 µl	Yellow
2	<u>Enzyme Mix</u>	1x	160 µl	Red
R	<u>Internal Control RNA</u>	4x	1700 µl	Brown
N	<u>No Template Control</u>	1x	450 µl	White
P	<u>Positive Control</u>	1x	200 µl	Blue

5. Storage instructions

- All reagents must be stored away from light at -20 °C and, if unopened, can be used until the expiration date printed on the label. After the expiration date, the quality guarantee is no longer valid.
- All reagents should be carefully thawed prior to use (e.g., in a refrigerator at 2 °C to 8 °C).
- Repeated freezing/thawing of up to 5 times does not have an impact on the test property (if necessary, create aliquots after the first thaw and refreeze reagents immediately).
- Cool all reagents appropriately during PCR preparation (2 °C to 8 °C).

6. Reagents required but not provided

The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR test was verified using the following combination of extraction platform and real-time PCR device:

Tab.2a: Necessary equipment (verified)

Extraction platform	
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR device	
Roche	LightCycler® 480II

Also, the RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR test is compatible for use with the following real-time PCR devices:

Table 2b: Necessary equipment (compatible)

Real-time PCR devices	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: When using Rotor-Gene Q (QIAGEN), use only 0.1-ml reaction vials.

Should you have to use other extraction procedures or real-time PCR devices, please contact R-Biopharm to check the compatibility at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) when using LightCycler® 480II
- Real-time PCR consumables (plates, reaction vials, films)
- Centrifuge with rotor for reaction vials or plates
- Vortexer
- Pipettes (0.5 to 20 µl, 20 to 200 µl, 100 to 1,000 µl)
- Pipette tips with filters
- Powder-free disposable gloves
- PCR water (nuclease-free)

7. Warnings and precautions for the users

For *in-vitro* diagnostic use.

- This test must be carried out only by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories must be followed.
- Always adhere strictly to the instructions for use when carrying out this test.
- Do not pipette samples or reagents using your mouth. Avoid contact with broken skin and mucous membranes.
- Wear personal protective equipment (appropriate gloves, lab coat, safety glasses) when handling reagents and samples, and wash hands after completing the test.
- Do not smoke, eat, or drink in areas where samples are handled.
- Ensure that the extraction, PCR preparation, and PCR are carried out in different rooms in order to avoid cross-contaminations.
- Clinical samples must be viewed as potentially infectious and must be disposed of appropriately, like all reagents and materials that come into contact with potentially infectious samples.
- Dispose of test kit once the expiration date has lapsed.
- Users are responsible for proper disposal of all reagents and materials after use. For disposal, please adhere to national regulations.

For further details, see the safety data sheets (SDS) on R-Biopharm's website.

8. Collection and storage of samples

8.1 RNA preparation from human respiratory samples

A commercially available nucleic acid extraction kit (e.g., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) or nucleic acid extraction system (e.g., Maxwell® RSC [Promega]) is recommended for RNA preparation from human respiratory samples. The manufacturer's instructions must be observed.

The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 test contains an **Internal Control RNA** that indicates potential PCR inhibition, checks the integrity of the reagents, and confirms successful nucleic acid extraction. The **Internal Control RNA** can be used either only as an inhibition control or as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as an inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** must be added to the master mix for each reaction (see Table 4).

If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation **and** as an inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** must be used for each sample during extraction. The **Internal Control RNA** should be added to the sample/lysis buffer mix and should **not** be added directly to the sample material. We

recommend adding 1 µl to the PCR mix of the negative control and of the positive control for each reaction of the **Internal Control RNA**.

9. Test procedure

9.1 Master Mix preparation

The total number of the reactions needed for PCR (samples and control reactions) must be calculated. One positive control and one negative control must be included in each test run.

Adding an additional 10 % volume to the master mix is recommended in order to balance out the pipette loss (see Table 3, Table 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control RNA** before using. Always cool reagents appropriately during the work steps (2 °C to 8 °C).

Table 3: Example of the calculation and preparation of the master mix for 10 reactions (ICR as extraction and inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

Table 4: Example of the calculation and preparation of the master mix for 10 reactions (ICR only as inhibition control)

Kit code	Components of the master mix	Quantity per reaction	10 reactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the master mix and then centrifuge for short time.

9.2 Preparation of the PCR Mix

Pipette 20 µl of the master mix into each reaction vial (vial/plate).

Negative control: Pipette 5 µl of the **No Template Control** into the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** by pipette to the RT-PCR mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl eluate to the pre-pipetted master mix.

Positive control: Add 5 µl of the **Positive Control** to the pre-pipetted master mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as an extraction control for sample preparation and as an inhibition control, we recommend adding 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR mix of the positive control.

Seal the reaction vials or plates, briefly centrifuge at slow speed, and transfer into the real-time PCR device. Start PCR according to PCR instrument set-up (see Table 5, Table 6, Table 7).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time RT-PCR profile

Table 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series and RIDA®CYCLER

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Table 6: Universal real-time RT-PCR profile for ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q, and CFX96™ Dx

<u>Reverse transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature transition rate/ ramp rate	Maximum

Note: **Annealing and extension take place in the same step.**

Note: **The universal real-time PCR profile can also be used for DNA tests if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR tests are combined in one run.**

9.4 Detection channel setting

Table 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Comment
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Influenza A/B	Green	-
	ICR	Yellow	
	SARS-CoV-2 E gene	Orange	
	SARS-CoV-2 RdRp gene	Red	
Roche LightCycler® 480II	Influenza A/B	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required.
	ICR	533/580	
	SARS-CoV-2 E gene	533/610	
	SARS-CoV-2 RdRp gene	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Influenza A/B	FAM	Set the ROX passive reference dye to none.
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 E gene	ROX	
	SARS-CoV-2 RdRp gene	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Influenza A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 E gene	ROX	
	SARS-CoV-2 RdRp gene	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	Influenza A/B	Green	The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	Yellow	
	SARS-CoV-2 E gene	Orange	
	SARS-CoV-2 RdRp gene	Red	

10. Quality control

Samples are evaluated using the analysis software of the respective real-time PCR device according to the manufacturer's instructions. Negative and positive controls must show the correct results (see Table 8).

The **Positive Control** is present in a concentration of 10^3 copies/ μ l. It is used in a total quantity of 5×10^3 copies in every PCR run.

Table 8: A valid PCR run must meet the following conditions:

Sample	Result	ICR Ct	Target gene Ct
Positive control	Positive	N/A *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	Not detectable

**1 A Ct value for the ICR is not needed to obtain a positive result of the positive control.*

The positive and negative controls are valid when they meet the conditions specified in the table. The Ct range for the positive control is specified on the Quality Assurance Certificate included with the product. If one of the two controls does not meet the conditions for a valid run, all the reactions need to be re-analyzed, including the controls.

If the specified values are not met, check the following items before repeating the test:

- Expiration date of the reagents used
- Functionality of the equipment being used
- Correct test procedure

11. Sample interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

Table 9: Sample interpretation

Detection of				
E gene (SARS-CoV-2)	RdRp gene (SARS-CoV-2)	M gene/ NP1 gene (Influenza A/B)	ICR	Result
negative	negative	positive	positive/ negative	Influenza A/B detectable
positive	positive	negative	positive/ negative	SARS-CoV-2 detectable
positive	positive	positive	positive/ negative	SARS-CoV-2 and influenza A/B detectable
positive	negative	negative	positive/ negative	SARS-CoV-2 detectable
negative	positive	negative	positive/ negative	SARS-CoV-2 detectable*
negative	negative	negative	positive	Target gene not detectable
negative	negative	negative	negative	Invalid

* Potential weak cross-reactivity to SARS-CoV-1

A sample is positive if the sample RNA and the Internal Control RNA show an amplification signal in the detection system.

The E gene segment detected in this test is a SARS-CoV-2-specific fragment. In the BLAST alignment, the detected RdRp gene segment shows a few matches with the corresponding SARS-CoV-1 sequence segment. Amplification cannot be completely ruled out in this case.

The sensitivity of these two fragments in the SARS-CoV-2 samples within the LoD range can vary slightly, which can lead to only one of the two genes testing positive within the LoD range.

A sample is also positive if the sample RNA shows an amplification signal, but no amplification signal can be seen for the Internal Control RNA in the detection system. Detecting the Internal Control RNA is not necessary in this case because high amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

A sample is negative if the sample RNA does not show an amplification signal, but an amplification signal is visible for the Internal Control RNA in the detection system.

Inhibition of the PCR reaction can be ruled out by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is invalid if the sample RNA and the Internal Control RNA do not show an amplification signal in the detection system. There are PCR inhibitors in the sample, or an error occurred during the extraction process. The extracted sample should be diluted 1:10 with PCR water and re-amplified, or the isolation and purification of the sample should be improved.

12. Limitations of the method

1. This test is intended only for human nasal/throat swabs.
2. Improper specimen sampling, transport, storage, and handling or a pathogen load below the test's analytical sensitivity can lead to false negative results.
3. Mutations or polymorphisms in the primer or probe binding sites can interfere with the detection of new or unknown variants and can lead to false negative results using the RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 test.
4. As with all PCR-based *in-vitro* tests, extremely low concentrations of the target sequences under the limit of detection (LoD) can be detected. The results obtained are not always reproducible.
5. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. A positive result indicates that the corresponding target genes for influenza A (M gene), influenza B (NP1 gene), and SARS-CoV-2 (E gene; RdRp gene) are present.
6. The presence of RT-PCR inhibitors and interfering substances can lead to false negative or invalid results. The effects of vaccines, antiviral drugs, antibiotics, chemotherapy drugs, or immunosuppressants in the prevention of COVID-19 or in the treatment of the infection or other interfering substances have not been examined.
7. This assay is intended to be performed in compliance with the regulation on good laboratory practice (GLP). Users must follow exactly the manufacturer's instructions when performing the test.

13. Performance characteristics

13.1 Precision

The precision of the RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR test was determined for the following levels of consideration.

Intra-assay precision: Determination of five control samples using 20 replicates each on LightCycler® 480II under identical conditions.

Inter-assay precision: Determination of five control samples in duplicate on ten work days performed by different technicians under reproducible conditions.

Inter-lot precision: Testing for intra- and inter-assay precision was carried out using three different lots.

The obtained coefficients of variation of each measurement using the RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR test on LightCycler® 480II were less than 2.5 %.

13.2 Analytical sensitivity

13.2.1 Device detection limit

For determining the device detection limit, 20 replicates of a control sample (each with 50 copies/reaction) were measured on LightCycler® 480II. All replicates were positive.

The device detection limit is therefore 50 copies/reaction.

13.3 Analytical specificity

The RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 real-time PCR test is specific for human SARS-CoV-2 and flu A/flu B in nasal/throat swabs.

Different organisms were also tested. No cross-reactivities with the following species were detected (see Table 10):

Table 10: Cross-reactivity testing

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

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Enterovirus type 71, strain 2003 isolate	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	Human coronavirus 229E	-	Human coronavirus OC43	-
Human coronavirus HKU1	-	Human coronavirus NL63	-	Human coxsackievirus A2, strain Fleetwood	-	Human coxsackievirus B4	-
Human cytomegalovirus	-	Human metapneumovirus	-	Human parainfluenza virus 1 strain C35	-	Human parainfluenza virus 2 strain Greer	-
Human parainfluenza virus serotype 3	-	Human parainfluenza virus 4a strain M-25	-	Human parainfluenza virus 4b strain CH19503	-	Human respiratory syncytial virus strain long	-
Human respiratory syncytial virus strain 9320	-	Human rhinovirus genogroup A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain MGH 78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Mumps virus genotype G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> strain FH of Eaton Agent	-	<i>Neisseria meningitidis</i> strain FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-				

13.4 Analytical reactivity

The analytical reactivity of the RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR was examined using different strains of influenza A/B viruses and SARS-CoV-2 (see Table 11).

Table 11: Analytical reactivity testing

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

B/Brisbane/60/2008	positive	negative	negative
B/Washington/02/2019	positive	negative	negative
B/Phuket/3073/2013	positive	negative	negative

14. Version history

Version number	Section and designation
2020-12-08	Release version

15. Explanation of symbols

General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Batch number
	Use before
	Store at
	Item number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Test-specific symbols

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. References

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Accessed: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Accessed: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Accessed: 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Accessed: 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Accessed: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Accessed: 16.09.2020

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF PG6825

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. El ensayo de RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2, realizado en el dispositivo de PCR en tiempo real LightCycler® 480II, es una prueba de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación del ARN del virus de la gripe A/gripe B y el coronavirus (SARS-CoV-2) en hisopos nasales/faríngeos de personas con signos y síntomas de infección respiratoria.

El ensayo RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 está previsto para asistir en el diagnóstico diferencial de infecciones por el virus de la gripe A/gripe B y SARS-CoV-2 en pacientes con síntomas de infección respiratoria relacionados con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan la infección por virus de la gripe A/gripe B o SARS-CoV-2 y no deben usarse como la única base para el diagnóstico. El producto está destinado a ser utilizado por profesionales que trabajan en laboratorios hospitalarios, laboratorios de referencia, laboratorios privados o laboratorios públicos.

2. Resumen y descripción del ensayo

A finales de diciembre de 2019 en la ciudad china de Wuhan, tuvieron lugar numerosos casos de neumonía de causa desconocida.¹ A principios de enero de 2020, las autoridades chinas identificaron un coronavirus nuevo (SARS-CoV-2) como la causa de estas enfermedades.¹ La enfermedad provocada por el SARS-CoV-2 se denominó oficialmente COVID-19 ("enfermedad por coronavirus 2019") y se transmite de humano a humano.² Debido a la novedad de este patógeno, la epidemia evolucionó rápidamente a una pandemia.

A nivel mundial, se han registrado 66 422 058 casos (al 8 de diciembre de 2020).³ A finales de enero de 2020, también se confirmaron los primeros casos en Alemania. Alemania ha tenido 1 197 709 casos hasta ahora (al 8 de diciembre de 2020).⁴ La OMS la declaró una emergencia de salud pública de interés internacional el 2020-01-31.¹

Los virus SARS-CoV-2 y de la gripe comparten algunas similitudes. Por ejemplo, la principal ruta de transmisión de estos patógenos es la ruta aérea a través de gotas respiratorias cargadas de virus, generadas al respirar, toser, hablar o estornudar.^{5,6} Los síntomas en la etapa temprana son típicos para patógenos respiratorios virales. La mayoría de los síntomas notificados con más frecuencia son fiebre, tos y congestión nasal. Ya que la evolución de la enfermedad por SARS-CoV-2 varía ampliamente en los síntomas y la gravedad (desde asintomático hasta neumonía grave con insuficiencia pulmonar y la muerte), resulta importante diferenciar entre el virus del SARS-CoV-2 y los de la gripe para un tratamiento adicional.

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación del ARN del virus de la gripe A/gripe B y el coronavirus (SARS-CoV-2) en hisopos humanos nasales/faríngeos. La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) va seguida de la PCR en un vial de reacción. En el proceso, el ARN aislado se transcribe en ADNc con la ayuda de una transcriptasa inversa. Enseguida, se usa PCR en tiempo real para ampliar los fragmentos genéticos del virus de la gripe A (gen M), gripe B (gen NP1) y SARS-CoV-2 (gen E y gen RdRp). Las secuencias diana amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq-Polymerase separa al indicador del extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta con la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contiene un Internal Control RNA (ICR) para poder controlar la preparación de las muestras y/o cualquier posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 200 determinaciones).

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	4x	1050 µl	Amarillo
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	Rojo
R	Internal Control RNA	4x	1700 µl	Café
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a -20 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 °C - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 5 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a las propiedades del ensayo (si es necesario, prepare alícuotas tras la primera descongelación y vuelva a congelar los reactivos de inmediato).
- Refrigere todos los reactivos adecuadamente durante la preparación de la PCR (2 °C - 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 se verificó con la siguiente combinación de plataforma de extracción y dispositivo de PCR en tiempo real:

Tabla 2a: Equipo necesario (verificado)

Plataforma de extracción	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivo de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480II

Además, el ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 es compatible para utilizarse con los siguientes dispositivos de PCR en tiempo real:

Tabla 2b: Equipo necesario (compatible)

Dispositivos de PCR en tiempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Al emplear el Rotor-Gene Q (QIAGEN), use únicamente viales de reacción de 0,1 ml.

Si necesita usar otros procedimientos de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm para comprobar la compatibilidad en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) al usar el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, viales de reacción, cubiertas de plástico)
- Centrífuga con rotor para placas o viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas de pipeta con filtros
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga siempre las instrucciones de uso al llevar a cabo esta prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.
- Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.
- No fume, coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.
- Asegúrese de que la extracción, la preparación de PCR y la PCR se lleven a cabo en cuartos separados, con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.
- Deseche el kit de ensayo cuando alcance la fecha de caducidad.
- Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta y responsable todos los reactivos y materiales usados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Para obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en el sitio web de R-Biopharm.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación del ARN a partir de muestras respiratorias humanas

Para la preparación de ARN a partir de muestras respiratorias humanas, se recomienda un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, Maxwell® RSC [Promega]) que estén disponibles en el mercado. Deben seguirse las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** que indica la posible inhibición de la PCR, comprueba la integridad de los reactivos y confirma la extracción correcta de los ácidos nucleicos. El **Internal Control RNA** puede usarse ya sea únicamente como control de inhibición o como control de extracción para la preparación de las muestras, y como control de inhibición.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición, se debe añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra por cada reacción (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se debe añadir 20 µl de **Internal Control RNA** durante la extracción por cada muestra. El **Internal Control RNA** debe añadirse a la mezcla de muestra y tampón de lisado, y **no** directamente al material de muestra. Se recomienda agregar 1 µl a la mezcla de PCR del control negativo y del control positivo para cada reacción del **Internal Control RNA**.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Debe calcularse el número total de reacciones (reacciones de muestras y de control) necesario para la PCR. En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda añadir un volumen adicional del 10 % a la mezcla maestra para compensar las pérdidas por pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos.

Refrigere siempre los reactivos de forma adecuada durante las etapas del trabajo (2 °C - 8 °C).

Tabla 3: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR como control de extracción e inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

Tabla 4: Ejemplo del cálculo y la preparación de la mezcla maestra para 10 reacciones (ICR solo como control de inhibición)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Cantidad por reacción	10 reacciones (más 10 %)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle la mezcla maestra y centrifugue durante un breve lapso.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (vial/placa).

Control negativo: Pipetee 5 µl del **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control RNA** mediante una pipeta a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Añada 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl del **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción para la preparación de las muestras y como control de inhibición, se recomienda añadir 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Selle los viales o placas de reacción, centrifugue brevemente y transfiera al dispositivo de PCR en tiempo real. Comience la PCR de acuerdo con la configuración del dispositivo de PCR (consulte las tablas 5, 6 y 7).

9.3 Configuración del dispositivo de PCR

9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® y en el RIDA®CYCLER

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en el ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q y CFX96™ Dx

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura/ Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión pueden ocurrir en el mismo paso.

Nota: El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Dispositivo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Comentario
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Gripe A/B	Verde	-
	ICR	Amarillo	
	Gen SARS-CoV-2 E	Naranja	
	Gen SARS-CoV-2 E RdRp	Rojo	
Roche LightCycler® 480II	Gripe A/B	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Gen SARS-CoV-2 E	533/610	
	Gen SARS-CoV-2 E RdRp	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Gripe A/B	FAM	Establezca el colorante de referencia pasivo ROX en "none" (ninguno).
	ICR	VIC	
	Gen SARS-CoV-2 E	ROX	
	Gen SARS-CoV-2 E RdRp	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Gripe A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Gen SARS-CoV-2 E	ROX	
	Gen SARS-CoV-2 E RdRp	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Gripe A/B	Verde	La ganancia debe establecerse en 5 (predeterminado de fábrica) para todos los canales.
	ICR	Amarillo	
	Gen SARS-CoV-2 E	Naranja	
	Gen SARS-CoV-2 E RdRp	Rojo	

10. Control de calidad

Las muestras se evalúan con el software de análisis del dispositivo de PCR en tiempo real respectivo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los controles negativo y positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8).

El **Positive Control** está presente en una concentración de 10^3 copias/ μ l. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

Tabla 8: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	Ct del ICR	Ct de genes diana
Control positivo	Positivo	N/D *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

**1 No es necesario tener un valor de Ct para el ICR para obtener un resultado positivo del control positivo.*

Los controles positivo y negativo son válidos cuando cumplen las condiciones especificadas en la tabla. El rango de Ct para el control positivo se especifica en el Certificado de Garantía de Calidad incluido con el producto. Si uno de los dos controles no cumple las condiciones para una corrida válida, todas las reacciones deben volver a analizarse, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

11. Interpretación de las muestras

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Detección de			ICR	Resultado
Gen E (SARS-CoV-2)	Gen RdRp (SARS-CoV-2)	Gen M/ gen NP1 (Gripe A/B)		
negativo	negativo	positivo	positivo/ negativo	Gripe A/B detectable
positivo	positivo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 detectable
positivo	positivo	positivo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 y gripe A/B detectables
positivo	negativo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 detectable
negativo	positivo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 detectable*
negativo	negativo	negativo	positivo	Gen diana no detectable
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

* Reactividad cruzada débil posible a SARS-CoV-1

Una muestra es positiva si, tanto el ARN de la muestra como el Internal Control RNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

El segmento del gen E detectado en este ensayo es un fragmento específico del SARS-CoV-2. En la alineación BLAST, el segmento del gen RdRp muestra pocas correspondencias con el segmento de la secuencia de SARS-CoV-1 correspondiente. La amplificación no puede excluirse totalmente en este caso.

La sensibilidad de estos dos fragmentos en las muestras de SARS-CoV-2 en el intervalo del LD pueden variar ligeramente, lo que puede dar lugar a que solo uno de los dos genes resulte positivo dentro del intervalo del LD.

Una muestra también es positiva si el ARN de la muestra presenta señal de amplificación, pero no se puede ver ninguna señal de amplificación para el Internal Control RNA en el sistema de detección. La detección del Internal Control RNA no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del Internal Control RNA.

Una muestra es negativa si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control RNA**.

Una muestra no es válida si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción. La muestra extraída debe diluirse 1:10 con agua para PCR y amplificarse de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. Esta prueba está diseñada solo para hisopos nasales y faríngeos humanos.
2. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica, pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
3. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados negativos falsos con el ensayo RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2.
4. Como ocurre con todos los ensayos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LD). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
5. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que están presentes los genes objetivo correspondientes del virus de gripe A (gen M), gripe B (gen NP1) y SARS-CoV-2 (gen E; gen RdRp).
6. La presencia de inhibidores de RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. No se han estudiado los efectos de las vacunas, medicamentos antivirales, antibióticos, medicamentos quimioterapéuticos o inmunosupresores en la prevención de la COVID-19 o en el tratamiento de infecciones u otras sustancias interferentes.
7. Está previsto que este ensayo se realice de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir exactamente las instrucciones del fabricante al realizar el ensayo.

13. Características de rendimiento

13.1 Precisión

La precisión del ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 se determinó para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de cinco muestras de control con 20 réplicas cada una en el LightCycler® 480II en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de cinco muestras de control por duplicado durante diez días hábiles realizadas por diferentes operadores en condiciones reproducibles.

Precisión interlote: las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los coeficientes obtenidos de la variación de cada medición con el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 en LightCycler® 480II fueron inferiores al 2,5 %.

13.2 Sensibilidad analítica

13.2.1 Límite de detección del dispositivo

Para determinar el límite de detección del dispositivo, se midieron 20 réplicas de una muestra de control (cada una con 50 copias/reacción) en el LightCycler® 480II. Todas las réplicas fueron positivas.

Por lo tanto, el límite de detección del dispositivo es de 50 copias/reacción.

13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 es específico para los virus de la gripe A/gripe B y SARS-CoV-2 en hisopos nasales/faríngeos.

También se probaron varios microorganismos. No se detectaron reactividades cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

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

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Enterovirus tipo 71, cepa aislada 2003	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	Coronavirus humano 229E	-	Coronavirus humano OC43	-
Coronavirus humano HKU1	-	Coronavirus humano NL63	-	Virus de Coxsackie humano A2, cepa Fleetwood	-	Virus de Coxsackie humano B4	-
Citomegalovirus humano	-	Metaneumovirus humano	-	Virus de la parainfluenza humana 1, cepa C35	-	Virus de la parainfluenza humana 2, cepa Greer	-
Virus de la parainfluenza humana, serotipo 3	-	Virus de la parainfluenza humana 4a, cepa M-25	-	Virus de la parainfluenza humana 4b, cepa CH19503	-	Virus respiratorio sincitial humano cepa Long	-
Virus respiratorio sincitial humano cepa 9320	-	Rinovirus humano, genogrupo A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa MGH 78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus de paperas, genotipo G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , cepa FH de Eaton Agent	-	<i>Neisseria meningitidis</i> , cepa FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , cepa NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-				

13.4 Reactividad analítica

Se examinó la reactividad analítica del ensayo RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 usando diferentes cepas de los virus de la gripe A/B y SARS-CoV-2 (consulte la Tabla 11).

Tabla 11: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Gripe A/B	SARS-CoV-2 (gen E)	SARS-CoV-2 (gen RdRp)
SARS-CoV-2 (aislado: USA-WA1/2020)	negativo	positivo	positivo
SARS-CoV-2 (aislado: Italia-INMI1)	negativo	positivo	positivo
A/Brisbane/02/2018	positivo	negativo	negativo
A/Michigan/45/2015	positivo	negativo	negativo
A/California/7/2009	positivo	negativo	negativo
A/Brisbane/59/2007	positivo	negativo	negativo
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019	positivo	negativo	negativo
A/Kansas/14/2017	positivo	negativo	negativo
A/Singapur/INFIMH-16-0019/2016	positivo	negativo	negativo
A/Hong Kong/2671/2019	positivo	negativo	negativo
A/Texas/50/2012	positivo	negativo	negativo
A/Perth/16/2009	positivo	negativo	negativo
A/Anhui/1/2013	positivo	negativo	negativo
B/Colorado/06/2017	positivo	negativo	negativo

B/Brisbane/60/2008	positivo	negativo	negativo
B/Washington/02/2019	positivo	negativo	negativo
B/Phuket/3073/2013	positivo	negativo	negativo

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2020-12-08	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvense las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografía

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Fecha de última consulta: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Fecha de última consulta: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Fecha de última consulta: 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Fecha de última consulta: 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Fecha de última consulta: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Fecha de última consulta: 16.09.2020

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF

 PG6825

1. Application

Pour usage diagnostique in vitro. Le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2, exécuté sur le dispositif de RT-PCR en temps réel LightCycler® 480II, est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN de la grippe A/grippe B et du coronavirus (SARS-CoV-2) dans des frottis nasaux/de gorge humains provenant de personnes présentant des signes et des symptômes d'infection respiratoire aiguë.

Le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 est conçu pour étayer le diagnostic différentiel d'infections par la grippe A/grippe B et le SARS-CoV-2 chez les patients présentant des symptômes d'une infection respiratoire conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par la grippe A/grippe B ou le SARS-CoV-2 et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic. L'utilisation de ce produit est réservée aux professionnels travaillant dans des laboratoires hospitaliers, des laboratoires de référence, des laboratoires privés ou des laboratoires publics.

2. Résumé et explication du test

Fin décembre 2019, dans la métropole chinoise de Wuhan, de nombreux cas de pneumonie de cause inconnue ont été observés¹. Début janvier 2020, les autorités chinoises ont identifié un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) comme en étant la cause¹. La maladie provoquée par le SARS-CoV-2 a été officiellement appelée COVID-19 (« maladie à coronavirus 2019 ») et se transmet d'une personne à l'autre². En raison de la nouveauté de cet agent pathogène, l'épidémie s'est rapidement transformée en pandémie.

66 422 058 cas ont déjà été enregistrés à travers le monde (en date du 8 décembre 2020)³. En Allemagne, les premiers cas ont été confirmés fin janvier 2020. À ce jour, 1 197 709 cas ont été recensés en Allemagne (en date du 8 décembre 2020)⁴. Le 31 janvier 2020, l'OMS a qualifié l'épidémie d'« urgence de santé publique de portée internationale »¹.

Le SARS-CoV-2 et les virus de la grippe présentent des similitudes. Par exemple, la principale voie de transmission de ces agents pathogènes est la voie aérienne par l'intermédiaire de gouttelettes respiratoires chargées de virus qui sont produites lorsque l'on respire, tousse, parle et éternue.^{5,6} Au premier stade, les symptômes sont habituellement ceux des agents pathogènes viraux respiratoires. Parmi les symptômes les plus fréquemment associés à ces agents pathogènes, on trouve la fièvre, la toux et la congestion nasale. Étant donné que l'évolution de la maladie à SARS-CoV-2 peut considérablement varier sur le plan des symptômes et de la gravité (de l'absence de symptômes à une pneumonie grave provoquant une insuffisance pulmonaire et la mort), la différenciation du SARS-CoV-2 et des virus de la grippe est importante pour des traitements ultérieurs.

3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN de la grippe A/grippe B et du coronavirus (SARS-CoV-2) dans des frottis nasaux/de gorge humains.

La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape: la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé est transcrit en ADNc à l'aide d'une transcriptase inverse. Ensuite, la PCR en temps réel est utilisée pour amplifier les fragments de gène pour la grippe A (gène M), la grippe B (gène NP1) et le SARS-CoV-2 (gène E et gène RdRp). Les séquences cibles amplifiées sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la **Taq-Polymerase** sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contient un **Internal Control RNA** (ICR) pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou l'éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 200 déterminations.)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	4x	1 050 µl	Jaune
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	Rouge
R	Internal Control RNA	4x	1 700 µl	Brun
N	No Template Control	1x	450 µl	Blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	Bleu

5. Instructions de conservation

- Tous les réactifs doivent être conservés à -20 °C et à l'abri de la lumière et, s'ils ne sont pas ouverts, peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Il est possible de congeler/décongeler les produits jusqu'à 5 fois sans altérer la propriété du test (au besoin, créer des aliquotes après la première décongélation et recongeler immédiatement les réactifs).
- Refroidir correctement tous les réactifs pendant la préparation de la PCR (2 à 8 °C).

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 a été testé à l'aide de la combinaison de plateforme d'extraction et de dispositif de PCR en temps réel suivante:

Tableau 2a: Matériel nécessaire (vérifié)

Plateforme d'extraction	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositif de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480II

De plus, le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 est compatible avec les dispositifs de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2b: Matériel nécessaire (compatible)

Dispositifs de PCR en temps réel	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: en cas d'utilisation du Rotor-Gene Q (QIAGEN), utiliser uniquement des flacons de réaction de 0,1 ml.

Si vous devez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de pour en vérifier la compatibilité.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) lors de l'utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, flacons de réaction, films)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons ou les plaques de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes pour pipette dotées de filtres
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

- Ce test doit uniquement être réalisé par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec les plaies et les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être effectuées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit.

- Éliminer le kit de test à l'échéance de la date de péremption.
- Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de la mise au rebut appropriée de tous les réactifs et matériaux. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur le site Internet R-Biopharm.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ARN à partir d'échantillons respiratoires humains

Un kit d'extraction d'acides nucléiques disponible dans le commerce (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell®RSC [Promega]) est recommandé pour la préparation de l'ARN à partir d'échantillons respiratoires humains. Il convient de respecter les instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 comprend un **Internal Control DNA** qui indique une éventuelle inhibition de la PCR, vérifie l'intégrité des réactifs et confirme la réussite de l'extraction d'acides nucléiques. Le **Internal Control RNA** peut être utilisé uniquement comme un contrôle de l'inhibition ou comme un contrôle de l'extraction pour la préparation des échantillons en plus d'un contrôle de l'inhibition.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître pour chaque réaction (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en utiliser 20 µl pour chaque échantillon pendant l'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il convient d'ajouter 1 µl au mélange pour la PCR pour le contrôle négatif et le contrôle positif pour chaque réaction du **Internal Control RNA**.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions (échantillons et réactions de contrôle) nécessaires à la PCR. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Il est recommandé d'ajouter 10 % de volume de mélange maître de plus afin de compenser la perte au pipetage (voir tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA** avant utilisation. Toujours refroidir les réactifs correctement pendant les étapes de travail (2 à 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR pour extraction et contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

Tableau 4: Exemple de calcul et de préparation du mélange maître pour 10 réactions (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition)

Code du kit	Composants du mélange maître	Quantité par réaction	10 réactions (plus 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger le mélange maître, puis centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (flacon/plaque).

Contrôle négatif: Pipeter 5 µl de **No Template Control** dans le mélange maître pré-pipeté.

Remarque: Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl, à l'aide d'une pipette, au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pipeté au préalable.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pipeté au préalable.

Remarque: Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Fermer hermétiquement les flacons ou les plaques de réaction, les centrifuger brièvement à faible vitesse et les transférer vers un dispositif de PCR en temps réel. Démarrer la PCR selon les réglages du dispositif de PCR (voir tableaux 5, 6 et 7).

9.3 Configuration du dispositif de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de la RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler® et RIDA®CYCLER

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximale

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q et CFX96™ Dx

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ vitesse de montée de température	Maximale

Remarque: L'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Remarque: Le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests de PCR en temps réel RIDA®GENE DNA et RIDA®GENE RNA sont combinés dans un même test.

9.4 Réglage du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Dispositif de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Commentaire
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Grippe A/B	Vert	-
	ICR	Jaune	
	SARS-CoV-2 gène E	Orange	
	SARS-CoV-2 gène RdRp	Rouge	
Roche LightCycler® 480II	Grippe A/B	465/510	Le kit RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire.
	ICR	533/580	
	SARS-CoV-2 gène E	533/610	
	SARS-CoV-2 gène RdRp	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Grippe A/B	FAM	Régler le colorant de référence passif ROX sur aucun.
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 gène E	ROX	
	SARS-CoV-2 gène RdRp	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Grippe A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	SARS-CoV-2 gène E	ROX	
	SARS-CoV-2 gène RdRp	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Grippe A/B	Vert	Les réglages de gain doivent être définis sur 5 (valeur par défaut d'usine) pour tous les canaux.
	ICR	Jaune	
	SARS-CoV-2 gène E	Orange	
	SARS-CoV-2 gène RdRp	Rouge	

10. Contrôle qualité

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse du dispositif de PCR en temps réel correspondant conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent afficher les résultats corrects (voir tableau 8). Le contrôle positif **Positive Control** est présent à une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque analyse de PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Tableau 8: Pour être valide, une exécution de PCR doit remplir les conditions suivantes:

Échantillon	Résultat	Ct ICR	Gène Ct cible
Contrôle positif	Positif	SO *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	Non détectable

**1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour obtenir un résultat positif de l'ICR pour le contrôle positif.*

Les contrôles positif et négatif sont valides lorsqu'ils satisfont les conditions indiquées dans le tableau. La plage de Ct pour le contrôle positif est indiquée dans le Certificat d'assurance qualité inclus avec le produit. Si l'un des deux contrôles ne satisfait pas les conditions pour valider une exécution, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Réalisation correcte du test

11. Interprétation des échantillons

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Détection				
Gène E (SARS-CoV-2)	Gène RdRp (SARS-CoV-2)	Gène M / Gène NP1 (Grippe A/B)	ICR	Résultat
négatif	négatif	positif	positif/ négatif	Grippe A/B détectable
positif	positif	négatif	positif/ négatif	SARS-CoV-2 détectable
positif	positif	positif	positif/ négatif	SARS-CoV-2 et grippe A/B détectables
positif	négatif	négatif	positif/ négatif	SARS-CoV-2 détectable
négatif	positif	négatif	positif/ négatif	SARS-CoV-2 détectable*
négatif	négatif	négatif	positif	Gène cible non détectable
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

* Possibilité de faible réaction croisée avec SARS-CoV-1.

Un échantillon est positif si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Le segment de gène E détecté dans ce test est un fragment spécifique du SARS-CoV-2. Dans l'alignement BLAST, le segment de gène RdRp détecté présente quelques correspondances avec le segment de séquence SARS-CoV-1 correspondant. L'amplification ne peut être totalement exclue dans ce cas.

La sensibilité de ces deux fragments dans les échantillons de SARS-CoV-2 dans la plage de LD peut varier légèrement, ce qui peut conduire au test positif d'un seul des deux gènes dans la plage de LD.

Un échantillon est également positif si l'ARN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le Internal Control RNA. La détection du Internal Control RNA n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control RNA.

Un échantillon est négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un visible pour le

Internal Control RNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du **Internal Control RNA**.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction. L'échantillon extrait doit être dilué selon un rapport 1:10 avec de l'eau de PCR et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Ce test est destiné uniquement aux frottis nasaux/de gorge.
2. Un prélèvement, échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
3. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2.
4. À l'instar de tous les tests *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LD) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
5. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles correspondants de la grippe A (gène M), de la grippe B (gène NP1) et du SARS-CoV-2 (gène E ; gène RdRp) sont présents.
6. La présence d'inhibiteurs de la RT-PCR et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. Les effets de vaccins, traitements antiviraux, antibiotiques, médicaments de chimiothérapie ou immunosuppresseurs dans la prévention de la COVID-19 ou le traitement de l'infection ou d'autres substances interférentes n'ont pas été étudiés.
7. Ce test est destiné à être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). Les utilisateurs doivent suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.

13. Performances

13.1 Précision

La précision du test de PCR en temps réel RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision intra-essai: détermination de cinq échantillons de contrôle avec 20 réplicats chacun sur le LightCycler® 480II dans des conditions identiques.

Précision inter-essais: détermination de cinq échantillons de contrôle en double pendant 10 jours ouvrables par différents techniciens dans des conditions reproductibles.

Précision inter-lots: les tests pour la précision intra-essai et inter-essais sont réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les coefficients de variation obtenus pour chaque mesure à l'aide du test de PCR en temps réel RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 sur le LightCycler® 480II étaient inférieurs à 2,5 %.

13.2 Sensibilité analytique

13.2.1 Limite de détection du dispositif

Pour déterminer la limite de détection du dispositif, 20 réplicats d'un échantillon de contrôle (chacun avec 50 copies/réaction) ont été mesurés avec le LightCycler® 480II. Tous les réplicats ont été positifs.

La limite de détection du dispositif est donc de 50 copies/réaction.

13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 est spécifique pour le SARS-CoV-2 humain et la grippe A/grippe B présents dans des frottis nasaux/de gorge.

Différents organismes ont également été testés. Aucune réactivité croisée avec les espèces suivantes n'a été détectée (voir tableau 10):

Tableau 10: Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i> souche 5377	-	Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Bordetella parapertussis</i> souche 12822	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
Échovirus 11	-	Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Entérovirus type 71 souche 2003 isolat	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-	Virus Herpes simplex 2 souche MS	-	Coronavirus humain 229E	-	Coronavirus humain OC43	-
Coronavirus humain HKU1	-	Coronavirus humain NL63	-	Coxsackievirus humain A2, souche Fleetwood	-	Coxsackievirus humain B4	-
Cytomégalovirus humain	-	Metapneumovirus humain	-	Virus parainfluenza humain 1 souche C35	-	Virus parainfluenza humain 2 souche Greer	-
Virus parainfluenza sérotypé 3	-	Virus parainfluenza humain 4a souche M-25	-	Virus parainfluenza humain 4b souche CH19503	-	Virus respiratoire syncytial humain souche Long	-
Virus respiratoire syncytial humain souche 9320	-	Rhinovirus humain génogroupe A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH 78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus des oreillons génotype G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent	-	<i>Neisseria meningitidis</i> souche FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-				

13.4 Réactivité analytique

La réactivité analytique du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 a été examinée en utilisant différentes souches du virus de la grippe A/B et du SARS-CoV-2 (voir tableau 11).

Tableau 11: Test de la réactivité analytique

Souche	Grippe A/B	SARS-CoV-2 (gène E)	SARS-CoV-2 (gène RdRp)
SARS-CoV-2 (isolat: USA-WA1/2020)	négatif	positif	positif
SARS-CoV-2 (isolat: Italie-INMI1)	négatif	positif	positif
A/Brisbane/02/2018	positif	négatif	négatif
A/Michigan/45/2015	positif	négatif	négatif
A/Californie/7/2009	positif	négatif	négatif
A/Brisbane/59/2007	positif	négatif	négatif
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019	positif	négatif	négatif
A/Kansas/14/2017	positif	négatif	négatif
A/Singapour/INFIMH-16-0019/2016	positif	négatif	négatif
A/Hong Kong/2671/2019	positif	négatif	négatif
A/Texas/50/2012	positif	négatif	négatif
A/Perth/16/2009	positif	négatif	négatif
A/Anhui/1/2013	positif	négatif	négatif
B/Colorado/06/2017	positif	négatif	négatif

B/Brisbane/60/2008	positif	négatif	négatif
B/Washington/02/2019	positif	négatif	négatif
B/Phuket/3073/2013	positif	négatif	négatif

14. Historique des versions

Numéro de version	Section et désignation
2020-12-08	Version de la publication

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique in vitro
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques des tests

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliographie

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html.
Dernier accès: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Dernier accès: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Dernier accès: 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html.
Dernier accès: 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html.
Dernier accès: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Dernier accès: 16.09.2020

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF**PG6825**

1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica in vitro. Il test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2, eseguito sullo strumento di PCR real-time LightCycler® 480II, è un test di RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA del virus influenzale A/B e del coronavirus (SARS-CoV-2) in tamponi nasali/faringei umani provenienti da persone con segni e sintomi di infezione respiratoria.

Il test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 ha lo scopo di supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da virus influenzale A/B e da SARS-CoV-2 in pazienti con sintomi di infezione respiratoria, in connessione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da virus influenzale A/B o SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi. Il prodotto è destinato all'uso da parte di professionisti che lavorano in laboratori ospedalieri, laboratori di riferimento, privati o pubblici.

2. Sintesi e spiegazione del test

Alla fine di dicembre 2019, nella metropoli cinese di Wuhan, si sono verificati numerosi casi di polmonite di eziologia sconosciuta.¹ All'inizio di gennaio 2020, le autorità cinesi hanno identificato un nuovo coronavirus (SARS-CoV-2) come causa di queste malattie.¹ La malattia causata da SARS-CoV-2 è stata ufficialmente denominata COVID-19 ("malattia da coronavirus 2019") e si trasmette da uomo a uomo.² Trattandosi di un patogeno nuovo, l'epidemia si è rapidamente trasformata in una pandemia.

In tutto il mondo all'8 dicembre 2020 sono già stati registrati 66.422.058 casi.³ Alla fine di gennaio 2020 sono stati registrati i primi casi anche in Germania. Alla data dell'8 dicembre 2020 la Germania ha registrato 1.197.709 casi.⁴ Il 31 gennaio 2020 l'OMS ha dichiarato un'emergenza di sanità pubblica di portata internazionale.¹

I virus SARS-CoV-2 e quelli dell'influenza condividono alcune analogie. Per esempio, entrambi si trasmettono principalmente per via aerea tramite goccioline cariche di virus diffuse respirando, tossendo, parlando e starnutendo.^{5,6} I sintomi nella fase iniziale sono tipici dei patogeni virali respiratori. I sintomi più spesso riportati per

entrambi i patogeni sono febbre, tosse e congestione nasale. Poiché il decorso della malattia da SARS-CoV-2 può variare notevolmente in termini di sintomi e gravità (dalla forma asintomatica alla polmonite grave con insufficienza polmonare ed esito fatale), la differenziazione tra i virus della SARS-CoV-2 e quelli influenzali è importante per instaurare la terapia idonea.

3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è un test di RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA del virus influenzale A/B e del coronavirus (SARS-CoV-2) in tamponi nasali/faringei umani.

La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase: la trascrizione inversa (RT) e la successiva PCR hanno luogo nella medesima cuvetta di reazione. Nel processo, l'RNA isolato viene trascritto in cDNA con l'ausilio di una trascrittasi inversa. Successivamente si utilizza la PCR real-time per amplificare i frammenti del gene del virus dell'influenza A (gene M), dell'influenza B (gene NP1) e del SARS-CoV-2 (gene E e gene RdRp). Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** (ICR) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 200 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	4x	1050 µl	Giallo
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	Rosso
R	Internal Control RNA	4x	1700 µl	Marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	Bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	Blu

5. Istruzioni di conservazione

- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C, e prima dell'apertura possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati con cura prima dell'uso (ad esempio in frigorifero da +2 °C a +8 °C).
- Il congelamento/lo scongelamento ripetuto fino a 5 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (da 2 a 8 °C).

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è stato verificato con le seguenti piattaforme di estrazione abbinate a strumenti di PCR real-time:

Tabella 2a: Attrezzatura necessaria (verificata)

Piattaforma di estrazione	
Promega	Maxwell® RSC
Strumento di PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480II

Inoltre, il test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è compatibile con gli strumenti di PCR real-time elencati di seguito:

Tabella 2b: Attrezzatura necessaria (compatibile)

Strumenti di PCR real-time	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: quando si utilizza il Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilizzare solo cuvette di reazione da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre procedure di estrazione o strumenti di PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de per verificare la compatibilità.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, cuvette di reazione, pellicole)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione o piastre
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Puntali per pipette con filtri
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

7. Avvertenze e misure precauzionali

Per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.
- Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.
- Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.
- Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.
- Assicurarsi che l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR avvengano in locali separati per evitare contaminazioni incrociate.
- I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.
- Dopo la data di scadenza smaltire il kit.
- Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

Per ulteriori dettagli consultare le schede dei dati di sicurezza (SDS) sul sito web di R-Biopharm.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da campioni respiratori umani

Per la preparazione dell'RNA da campioni respiratori umani si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come ad esempio RIDA®Xtract [R-Biopharm]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell® RSC [Promega]). Attenersi alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contiene un **Internal Control RNA** che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti, e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato solo come controllo di inibizione oppure come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione.

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato solo come controllo di inibizione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix di ogni reazione (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene utilizzato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA** per ogni campione.

L'**Internal Control RNA** deve essere aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi e **non** direttamente al materiale del campione. Raccomandiamo di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione nella PCR Mix, sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

L'aggiunta di un ulteriore 10% di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso, scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente **Reaction Mix**, **Enzyme Mix**, **Positive Control**, **No Template Control** e **Internal Control RNA**. Raffreddare adeguatamente i reagenti durante le fasi di lavoro (da 2 a 8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICR come controllo di estrazione e di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

Tabella 4: Esempio di calcolo e preparazione della Master Mix per 10 reazioni (ICR solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10%)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (cuvetta o piastra).

Controllo negativo: Pipettare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere con una pipetta 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

Campioni: Aggiungere 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: Aggiungere 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo positivo.

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nello strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7).

9.3 Impostazione dello strumento di PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tabella 5: Profilo RT-PCR real-time universale per la serie LightCycler® e RIDA®CYCLER

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo RT-PCR real-time universale per ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q e CFX96™ Dx

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Nota: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento di PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Influenza A/B	Verde	-
	ICR	Giallo	
	Gene E SARS-CoV-2	Arancione	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Rosso	
Roche LightCycler® 480II	Influenza A/B	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Gene E SARS-CoV-2	533/610	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Influenza A/B	FAM	Impostare il colorante di riferimento passivo ROX su nessuno.
	ICR	VIC	
	Gene E SARS-CoV-2	ROX	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Influenza A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Gene E SARS-CoV-2	ROX	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Influenza A/B	Verde	Il guadagno deve essere impostato su 5 (impostazione di fabbrica) per tutti i canali.
	ICR	Giallo	
	Gene E SARS-CoV-2	Arancione	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Rosso	

10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 8).

Il **Positive Control** è presente a una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni esecuzione della PCR.

Tabella 8: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Controllo positivo	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct >20	Non rivelabile

**1 Un valore Ct per l'ICR non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.*

I controlli positivi e negativi sono validi quando soddisfano le condizioni specificate nella tabella. L'intervallo Ct per il controllo positivo è specificato nel Certificato di garanzia di qualità accluso al prodotto. Se uno dei due controlli non soddisfa le condizioni per un'esecuzione valida, è necessario analizzare nuovamente tutte le reazioni, compresi i controlli.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Procedura di esecuzione del test corretta

11. Interpretazione del campione

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tabella 9: Interpretazione del campione

Rivelazione di				
Gene E (SARS-CoV-2)	Gene RdRp (SARS-CoV-2)	Gene M/ gene NP1 (Influenza A/B)	ICR	Risultato
negativo	negativo	positivo	positivo/ negativo	Influenza A/B rivelabile
positivo	positivo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 rivelabile
positivo	positivo	positivo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 e influenza A/B rivelabile
positivo	negativo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 rivelabile
negativo	positivo	negativo	positivo/ negativo	SARS-CoV-2 rivelabile*
negativo	negativo	negativo	positivo	Gene target non rivelabile
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

* Potenziale reattività crociata debole a SARS-CoV-1

Un campione è positivo se sia l'RNA del campione sia l'**Internal Control RNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Il segmento del gene E rivelato in questo test è un frammento specifico di SARS-CoV-2. Nell'allineamento BLAST, il segmento del gene RdRp rivelato mostra alcune corrispondenze con il segmento della sequenza di SARS-CoV-1 corrispondente. In questo caso non si può escludere completamente l'amplificazione.

La sensibilità di questi due frammenti nei campioni di SARS-CoV-2 nell'intervallo del LoD può variare leggermente, con la conseguenza che uno solo dei due geni risulterà positivo nell'intervallo del LoD.

Un campione è positivo anche se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma non è presente alcun segnale di amplificazione per l'**Internal Control RNA** nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l'**Internal Control RNA** perché concentrazioni elevate di ampliconi possono far sì che il segnale dell'**Internal Control RNA** sia debole o assente.

Un campione è negativo se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è visibile un segnale di amplificazione per l'**Internal Control RNA**

nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'**Internal Control RNA** esclude l'inibizione della reazione PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR nel campione o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con acqua per PCR e nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Questo test è destinato solo ai tamponi nasali/faringei umani.
2. Procedure inadeguate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni al di sotto della sensibilità analitica del test possono produrre falsi negativi.
3. Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione delle varianti nuove o sconosciute e produrre risultati falsi negativi utilizzando il test RIDA[®]GENE Flu & SARS-CoV-2.
4. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, possono essere identificate concentrazioni delle sequenze target estremamente basse, sotto il limite di rivelazione (LoD), ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
5. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target per l'influenza A (gene M), l'influenza B (gene NP1) e il SARS-CoV-2 (gene E; gene RdRp).
6. La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Non sono stati esaminati gli effetti di vaccini, farmaci antivirali, antibiotici, chemioterapici o immunosoppressori nella prevenzione della COVID-19 o nel trattamento dell'infezione, né di altre sostanze interferenti.
7. Questo test deve essere eseguito in conformità con il regolamento sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Gli operatori devono seguire esattamente le istruzioni del produttore.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Precisione

La precisione del test di PCR real-time RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è stata determinata per i seguenti livelli di considerazione.

Precisione intra-test: determinazione di cinque campioni di controllo utilizzando 20 replicati ciascuno su LightCycler® 480II in condizioni identiche.

Precisione inter-test: determinazione di cinque campioni di controllo in duplicato in dieci giorni lavorativi, eseguiti da diversi tecnici in condizioni riproducibili.

Precisione inter-lotto: i test di precisione intra- e inter-test sono stati effettuati utilizzando tre diversi lotti.

I coefficienti di variazione ottenuti di ogni misurazione utilizzando il test di PCR real-time RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 su LightCycler® 480II sono stati inferiori al 2,5%.

13.2 Sensibilità analitica

13.2.1 Limite di rivelazione dello strumento

Per determinare il limite di rivelazione dello strumento sono stati misurati 20 replicati di un campione di controllo (ciascuno con 50 copie/reazione) su LightCycler® 480II. Tutti i replicati erano positivi.

Il limite di rivelazione dello strumento è quindi di 50 copie/reazione.

13.3 Specificità analitica

Il test di PCR real-time RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è specifico per il virus SARS-CoV-2 e i virus influenzali A/B umani in tamponi nasali/faringei.

Sono stati testati anche altri microrganismi. Non sono state rivelate reattività crociate con le seguenti specie (vedere Tabella 10):

Tabella 10: Test di reattività incrociata

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

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Enterovirus tipo 71, ceppo 2003 isolato	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	-	Coronavirus 229E umano	-	Coronavirus OC43 umano	-
Coronavirus HKU1 umano	-	Coronavirus NL63 umano	-	Coxsackievirus umano A2, ceppo Fleetwood	-	Coxsackie B4 umano	-
Cytomegalovirus umano	-	Metapneumovirus umano	-	Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	-	Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	-
Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-	Virus parainfluenzale umano 4a, ceppo M-25	-	Virus parainfluenzale umano 4b, ceppo CH19503	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-	Rhinovirus umano genogruppo A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Virus della parotite genotipo G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	-	<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ceppo NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-				

13.4 Reattività analitica

La reattività analitica del test di RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 è stata esaminata utilizzando diversi ceppi dei virus influenzali A/B e SARS-CoV-2 (vedere Tabella 11).

Tabella 11: Test di reattività analitica

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

B/Brisbane/60/2008	positivo	negativo	negativo
B/Washington/02/2019	positivo	negativo	negativo
B/Phuket/3073/2013	positivo	negativo	negativo

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2020-12-08	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Uso per la diagnostica in vitro
	Leggere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografia

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Ultimo accesso: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Ultimo accesso: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Ultimo accesso: 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Ultimo accesso: 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Ultimo accesso: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Ultimo accesso: 16.09.2020

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2

REF PG6825

1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico in-vitro. O teste RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2, realizado no dispositivo PCR em tempo real LightCycler® 480II, é um RT-PCR em tempo real multiplex para a detecção qualitativa direta e diferenciação de gripe A/gripe B e de RNA do coronavírus (SARS-CoV-2) em esfregaços nasais e da garganta de pessoas com sinais e sintomas de infecção respiratória.

O teste RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 foi desenvolvido para apoiar o diagnóstico diferencial de infecções por gripe A/gripe B e SARS-CoV-2 em pacientes com sintomas de infecção respiratória em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não excluem a infecção por gripe A/gripe B e SARS-CoV-2 e não devem ser usados como única base para o diagnóstico. O produto é destinado ao uso por profissionais que trabalham em laboratórios hospitalares, laboratórios de referência, laboratórios particulares ou laboratórios públicos.

2. Sumário e explicação do teste

No final de dezembro de 2019, na metrópole chinesa de Wuhan, ocorreram numerosos casos de pneumonia de causa desconhecida.¹ No início de janeiro de 2020, as autoridades chinesas identificaram um novo coronavírus (SARS-CoV-2) como a causa dessas doenças.¹ A doença causada pela SARS-CoV-2 foi oficialmente nomeada COVID-19 (“doença do coronavírus 2019”) e é transmitida de humano para humano.² Devido à novidade deste patógeno, a epidemia evoluiu rapidamente para uma pandemia.

Já foram registrados 66.422.058 casos no mundo inteiro (até 08-Dez-20).³ No final de janeiro de 2020, os primeiros casos foram confirmados também na Alemanha. A Alemanha teve 1.197.709 casos até agora (até 08-Dez-20).⁴ A OMS declarou Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional em 2020-01-31.¹

Os vírus SARS-CoV-2 e influenza compartilham algumas semelhanças. Por exemplo, a principal rota de transmissão para estes dois patógenos é a rota aérea através de gotas respiratórias carregadas de vírus geradas pela respiração, tosse, fala e espirros.^{5,6} Os sintomas no estágio inicial são típicos de patógenos

respiratórios virais. Os sintomas mais comumente relatados para ambos os patógenos são febre, tosse e congestão nasal. Como os cursos da doença SARS-CoV-2 podem variar muito nos sintomas e na gravidade (de pneumonia assintomática a grave com insuficiência pulmonar e morte), a diferenciação dos vírus SARS-CoV-2 e influenza é importante para uma terapia adicional.

3. Princípio do teste

O RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 é um teste RT-PCR em tempo real multiplex para detecção qualitativa direta e diferenciação de gripe A/gripe B e de RNA do coronavírus (SARS-CoV-2) em esfregaços nasais e da garganta humana. A detecção é feita em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa: transcrição reversa (RT) e PCR subsequente ocorrem em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado é transcrito para o cDNA com a ajuda de uma transcriptase reversa. Em seguida, o PCR em tempo real é usado para amplificar os fragmentos de genes para influenza A (gene M), influenza B (gene NP1) e SARS-CoV-2 (gene E e gene RdRp). As sequências de alvo amplificadas são detectadas usando sondas de hidrólise que são etiquetadas com um supressor em uma extremidade e um corante de repórter fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência alvo. Durante a extensão, a Taq-Polymerase separa o repórter do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contém um Internal Control RNA (ICR) para ser capaz de controlar o preparo da amostra e/ou potencial de inibição do PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 200 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	4x	1050 µl	Amarelo
2	Enzyme Mix	1x	160 µl	Vermelho
R	Internal Control RNA	4x	1700 µl	Castanho
N	No Template Control	1x	450 µl	Branca
P	Positive Control	1x	200 µl	Azul

5. Instruções de armazenamento

- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz a -20 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 °C a 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetidos até 5 vezes não afeta as propriedades do teste (se necessário, crie alíquotas após o primeiro descongelamento e recongele os reagentes imediatamente).
- Arrefecer todos os reagentes adequadamente durante a preparação da PCR (2 °C a 8 °C).

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 foi verificado usando a seguinte combinação da plataforma de extração e dispositivo de PCR em tempo real:

Tabela 2a: Equipamento necessário (verificado)

Plataforma de extração	
Promega	Maxwell® RSC
Dispositivo de PCR em tempo real	
Roche	LightCycler® 480II

Além disso, o teste RT-PCR em tempo real multiplex RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 é compatível para uso com os seguintes dispositivos de PCR em tempo real:

Tabela 2b: Equipamento necessário (compatível)

Dispositivos PCR em tempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Applied Biosystems	ABI 7500 Fast Dx
Bio-Rad	CFX96™ Dx
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Ao usar o Rotor-Gene Q (QIAGEN), utilize apenas tubos de ensaio de 0,1 ml.

Se tiver que usar outros procedimentos de extração ou dispositivos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm para verificar a compatibilidade em mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) ao usar o LightCycler® 480II
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos de ensaio, filmes)
- Centrífuga com rotor para tubos de ensaio ou placas
- Vortexer
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1.000 µl)
- Pontas da pipeta com filtros
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (livre de nuclease)

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- Sempre cumpra estritamente as instruções de uso para a realização desse teste.
- Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.
- Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas.
- Garanta que a extração, a preparação da PCR e a PCR sejam realizadas em salas diferentes, a fim de evitar contaminações cruzadas.
- As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.
- Descarte o kit de teste assim que o prazo de validade expirar.
- Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Para maiores detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDSs) no site da R-Biopharm.

8. Coleta e armazenamento de amostra

8.1 Preparação de RNA a partir de amostras respiratórias humanas

Um kit de extração de ácido nucleico disponível no mercado (por exemplo, RIDA®Xtract [R-Biopharm]) ou sistema de extração de ácido nucleico (por exemplo, Maxwell® RSC [Promega]) é recomendado para a preparação de RNA a partir de amostras respiratórias humanas. As instruções do fabricante devem ser observadas.

O teste RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 contém um **Internal Control RNA** que indica potencial inibição da PCR, verifica a integridade dos reagentes e confirma a extração bem-sucedida de ácido nucleico. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado apenas como controle de inibição ou como controle de extração para preparo das amostra e como controle de inibição.

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à mistura principal para cada reação (consulte a Tabela 4).

Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como um controle de inibição, durante a extração, deve ser utilizado 20 µl do **Internal Control RNA** para cada amostra. O **Internal Control RNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente ao material de amostra. Recomendamos adicionar 1 µl à mistura do PCR do controle negativo e do controle positivo para cada reação do **Internal Control RNA**.

9. Realização do teste

9.1 Preparação da mistura principal

O número total de reações necessárias para a PCR (amostras e reações de controle) deve ser calculado. Em cada teste realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendável adicionar um volume adicional de 10% à mistura principal para equilibrar a perda de pipeta (consulte a Tabela 3, Tabela 4). Antes de usar, descongele, misture cuidadosamente e centrifugue brevemente o **Reaction Mix**, o **Enzyme Mix**, o **Positive Control**, o **No Template Control** e o **Internal Control RNA**. Sempre resfrie os reagentes adequadamente durante as etapas de trabalho (2 °C a 8 °C).

Tabela 3: Exemplo de cálculo e preparação da mistura principal para 10 reações (ICR como controle de extração e inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

Tabela 4: Exemplo do cálculo e preparação da mistura principal para dez 10 reações (ICR apenas como controle de inibição)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Quantidade por reação	10 reações (mais 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Misture a mistura principal e depois centrifugue por pouco tempo.

9.2 Preparação da mistura de PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (frasco/placa).

Controle negativo: Pipete 5 µl do **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

Nota: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos pipetar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle negativo.

Amostras: Adicione 5 µl de eluato à mistura principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl de **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

Nota: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o preparo da amostra e como controle de inibição, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle positivo.

Selar os tubos de ensaio ou placas, centrifugar brevemente em velocidade lenta e transferir para o dispositivo de PCR em tempo real. Inicie o PCR de acordo com a configuração do equipamento de PCR (consulte a Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7).

9.3 Configuração do dispositivo de PCR

9.3.1 Perfil de RT-PCR em tempo real universal

Tabela 5: Perfil de RT-PCR em tempo real universal para a LightCycler® series e RIDA®CYCLER

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Tabela 6: Perfil de RT-PCR em tempo real universal para ABI 7500 Fast Dx, Rotor-Gene Q e CFX96™ Dx

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

Nota: O perfil de PCR em tempo real universal também pode ser utilizado em testes de DNA se houver a combinação dos testes RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA em uma execução.

9.4 Configuração do canal de detecção

Tabela 7: Seleção dos canais de detecção adequados

Dispositivo de PCR em tempo real	Deteção	Canal de deteção	Comentário
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Influenza A/B	Verde	-
	ICR	Amarelo	
	Gene E SARS-CoV-2	Laranja	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Vermelho	
Roche LightCycler® 480II	Influenza A/B	465/510	É necessário o RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Gene E SARS-CoV-2	533/610	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	618/660	
ABI 7500 Fast Dx	Influenza A/B	FAM	Defina o corante de referência passiva ROX como nenhum.
	ICR	VIC	
	Gene E SARS-CoV-2	ROX	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Cy5	
Bio-Rad CFX96™ Dx	Influenza A/B	FAM	-
	ICR	VIC	
	Gene E SARS-CoV-2	ROX	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Influenza A/B	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas como 5 (padrão de fábrica) para todos os canais.
	ICR	Amarelo	
	Gene E SARS-CoV-2	Laranja	
	Gene RdRp SARS-CoV-2	Vermelho	

10. Controle de qualidade

As amostras são avaliadas usando o software de análise do respectivo dispositivo de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles negativos e positivos devem mostrar os resultados corretos (consulte a Tabela 8).

O **Positive Control** tem uma concentração de 10^3 cópias/ μ l. É usado em uma quantidade total de 5×10^3 cópias em cada execução de PCR.

Tabela 8: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	ICR Ct	Gene alvo Ct
Controle positivo	Positivo	N/A *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	Não detectável

**1 Um valor de Ct para o ICR não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.*

Os controles positivo e negativo são válidos quando atendem às condições especificadas na tabela. A faixa de Ct para o controle positivo é especificada no Certificado de Garantia da Qualidade incluído no produto. Se um dos dois controles não atender às condições para uma execução válida, todas as reações precisarão ser analisadas novamente, incluindo os controles.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

11. Interpretação das amostras

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9: Interpretação das amostras

Detecção de				
Gene E (SARS-CoV-2)	Gene RdRp (SARS-CoV-2)	Gene M/ Gene NP1 (Influenza A/B)	ICR	Resultado
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Influenza A/B detectável
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	SARS-CoV-2 detectável
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	SARS-CoV-2 e influenza A/B detectáveis
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	SARS-CoV-2 detectável
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	SARS-CoV-2 detectável*
negativo	negativo	negativo	positivo	Gene-alvo não detectável
negativo	negativo	negativo	negativo	Inválido

* Potencial fraca reatividade cruzada à SARS-CoV-1

Uma amostra é positiva caso a amostra e o **Internal Control RNA** apresentem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

O segmento do gene E detectado neste teste é um fragmento específico do SARS-CoV-2. No alinhamento BLAST, o segmento de gene RdRp detectado mostra algumas combinações com o segmento de sequência SARS-CoV-1 correspondente. A amplificação não pode ser completamente descartada neste caso.

A sensibilidade destes dois fragmentos nas amostras do SRA-CoV-2 dentro da faixa LoD pode variar ligeiramente, o que pode levar a que apenas um dos dois genes tenha um resultado positivo dentro da faixa LoD.

A amostra também é positiva se o RNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o **Internal Control RNA** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control RNA** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é negativa se o RNA da amostra não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o **Internal Control RNA** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do **Internal Control RNA**.

Uma amostra é inválida se o RNA da amostra e o **Internal Control RNA** não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Existem inibidores de PCR na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração. A amostra extraída deve ser diluída de 1:10 com água de PCR e re-amplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. Este teste se destina apenas para esfregaços nasais e de garganta humana.
2. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado de amostras ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
3. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o teste RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2.
4. Como em todos os testes *in-vitro* baseados em PCR, podem ser detectadas concentrações extremamente baixas das sequências alvo abaixo do limite de detecção (LoD). Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
5. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes alvo correspondentes para influenza A (gene M), influenza B (gene NP1) e SARS-CoV-2 (gene E; gene RdRp) estão presentes.
6. A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Os efeitos das vacinas, medicamentos antivirais, antibióticos, quimioterápicos ou imunossupressores na prevenção da COVID-19 ou no tratamento da infecção ou de outras substâncias interferentes não foram examinados.
7. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir exatamente as instruções do fabricante ao realizar o teste.

13. Características de desempenho

13.1 Precisão

A precisão do teste PCR em tempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão intraensaio: Determinação de cinco amostras de controle usando 20 réplicas, cada uma no LightCycler® 480II sob condições idênticas.

Precisão interensaio: Determinação de cinco amostras de controle em duas vezes em dez dias de trabalho realizadas por diferentes técnicos sob condições reprodutíveis.

Precisão interlote: Os testes de precisão intra e interensaio foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos de cada medição utilizando o teste PCR em tempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 no LightCycler® 480II foram inferiores a 2,5 %.

13.2 Sensibilidade analítica

13.2.1 Limite de detecção do dispositivo

Para determinar o limite de detecção do dispositivo, 20 réplicas de uma amostra de controle (cada uma com 50 cópias/reação) foram medidas no LightCycler® 480II. Todas as réplicas foram positivas.

O limite de detecção do dispositivo é, portanto, 50 cópias/reação.

13.3 Especificidade analítica

O teste PCR em tempo real RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 é específico para SARS-CoV-2 e gripe A/gripe B em esfregaços nasais/garganta.

Diferentes organismos também foram testados. Não foram detectadas reatividades cruzadas para as seguintes espécies (consulte a Tabela 10):

Tabela 10: Testes de reatividade cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i> estirpe 5377	-	Adenovírus 1, humano, estirpe de adenóide 71	-	Adenovírus 7, humano, estirpe Gomen	-	<i>Bordetella parapertussis</i> estirpe 12822	-
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
Echovírus 11	-	Vírus Epstein-Barr, estirpe B95-8	-	<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	-	<i>Escherichia coli</i> (O6)	-

<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Enterovírus tipo 71, estirpe 2003 isolada	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
Vírus Herpes Simplex 1, estirpe McIntyre	-	Vírus Herpes Simplex 2, estirpe MS	-	Coronavírus humano 229E	-	Coronavírus humano OC43	-
Coronavírus humano HKU1	-	Coronavírus humano NL63	-	Coxsackievírus humano A2, estirpe Fleetwood	-	Coxsackievirus humano B4	-
Citomegalovírus humano	-	Metapneumovírus humano	-	Vírus parainfluenza humana 1, estirpe C35	-	Vírus parainfluenza humana 2, estirpe Greer	-
Vírus parainfluenza sorotipo 3	-	Vírus parainfluenza humana 4a, estirpe M-25	-	Vírus parainfluenza humana 4b, estirpe CH19503	-	Vírus sincicial respiratório humano, estirpe longa	-
Vírus sincicial respiratório humano, estirpe 9320	-	Genogrupo A de rinovírus humano	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe MGH 78578	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i> subesp. Pneumophila	-	MERS	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	Vírus da Caxumba, genótipo G-198	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> estirpe FH de Eaton Agent	-	<i>Neisseria meningitidis</i> estirpe FAM18	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , estirpe NCTC 7465	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	<i>Streptococcus salivarius</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-				

13.4 Reatividade analítica

A reatividade analítica do RT-PCR em tempo real multiplex

RIDA®GENE Flu & SARS-CoV-2 foi examinada usando diferentes estirpes de vírus de influenza A/B e SARS-CoV-2 (consulte a Tabela 11).

Tabela 11: Testes de reatividade analítica

Estirpe	Influenza A/B	SARS-CoV-2 (Gene E)	SARS-CoV-2 (Gene RdRp)
SARS-CoV-2 (isolado: USA-WA1/2020)	negativo	positivo	positivo
SARS-CoV-2 (isolado: Itália-INMI1)	negativo	positivo	positivo
A/Brisbane/02/2018	positivo	negativo	negativo
A/Michigan/45/2015	positivo	negativo	negativo
A/California/7/2009	positivo	negativo	negativo
A/Brisbane/59/2007	positivo	negativo	negativo
A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019	positivo	negativo	negativo
A/Kansas/14/2017	positivo	negativo	negativo
A/Singapura/INFIMH-16-0019/2016	positivo	negativo	negativo
A/Hong Kong/2671/2019	positivo	negativo	negativo
A/Texas/50/2012	positivo	negativo	negativo
A/Perth/16/2009	positivo	negativo	negativo
A/Anhui/1/2013	positivo	negativo	negativo
B/Colorado/06/2017	positivo	negativo	negativo

B/Brisbane/60/2008	positivo	negativo	negativo
B/Washington/02/2019	positivo	negativo	negativo
B/Phuket/3073/2013	positivo	negativo	negativo

14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2020-12-08	Versão da edição

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de conservação
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Reaction Mix

Enzyme Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Referências

1. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/nCoV.html. Último acesso: 16.09.2020
2. <https://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/covid-19-weltgesundheitsorganisation-verkuendet-neuen-namen-des-coronavirus-a-810ce436-7081-43d2-b8e0-f0b315503e0b>. Último acesso: 12.02.2020
3. <https://covid19.who.int/>. Último acesso: 08.12.2020
4. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Fallzahlen.html. Último acesso: 08.12.2020
5. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html. Último acesso: 16.09.2020
6. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_box=1&cms_current=Influenza&cms_lv2=2961756. Último acesso: 16.09.2020