



## **PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2**

### **Multiplex-Realtime-RT-PCR-Assay zum Nachweis von SARS-CoV-2**



<b>Produkt</b>	<b>Plattform</b>	<b>Größe</b> (Reaktionen)	<b>Bestellnr.</b>
<b>PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2</b>	LC480 II CFX96 <sup>™</sup> Dx CFX96 Touch <sup>™</sup>	384	<b>REF 1301384</b>

#### **Zubehörprodukte – Analysesoftware**

<b>PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)</b>	<b>REF 99021</b>
<b>PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)</b>	<b>REF 99022</b>



**MedEnvoy**  
Prinzessinnen Margrietplantsoen 33 – Suite 123  
2595 AM Den Haag  
Die Niederlande



**SpeedX Pty Ltd**  
Suite 102, National Innovation Centre  
4 Cornwallis Street, Eveleigh  
NSW 2015, Australia

#### **NUR ZUR VERWENDUNG DURCH FACHPERSONAL**

Nicht zum Verkauf in den USA

## Inhalt

1	Produktbeschreibung .....	4
2	Verwendungszweck .....	4
3	Informationen zu Pathogenen .....	4
4	Kitinhalt .....	4
5	Versand und Lagerung .....	5
6	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	5
6.1	Allgemein .....	5
6.2	Labor .....	5
6.3	Probenhandhabung .....	5
6.4	Assay .....	5
6.5	Sicherheitsvorkehrungen .....	5
6.6	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für das Assay-Plugin .....	6
7	Erforderliches, jedoch nicht mitgeliefertes Material .....	6
8	Prinzip der Technologie .....	8
9	Verfahrensübersicht .....	9
10	Detaillierte Vorgehensweise .....	10
10.1	Probeentnahme, Transport und Lagerung .....	10
10.2	Probenbearbeitung .....	10
10.2.1	Reagenzvolumen für MGISP-960 .....	11
10.2.2	Reagenzvolumen für KingFisher Flex und PurePrep .....	11
10.3	Internal Control (Interne Kontrolle) (IC) .....	12
10.3.1	Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96, KingFisher Flex und PurePrep 96 .....	12
10.4	Vorbereitung der Echtzeit-PCR .....	12
10.4.1	Vorbereitung des Mastergemisches .....	12
11	Programmierung und Analyse .....	13
12	Interpretation der Ergebnisse .....	13
13	Einschränkungen .....	13
14	Qualitätskontrolle .....	14
15	Anweisungen für REDx™ FLOQ SARS-CoV-2-Positivkontrollen .....	14
15.1	Gebrauchsanweisung .....	14
16	Leistungsmerkmale .....	15
16.1	Klinische Leistung .....	15
16.1.1	Klinische Studie 1 .....	15
16.2	Analytische Leistung .....	15
16.2.1	Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit .....	15
16.2.1.1	LightCycler® 480 Instrument II .....	15
16.2.1.2	Für CFX96™ Dx Echtzeit-PCR-Nachweis und CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-Systeme .....	16
16.2.2	Analytische Sensitivität .....	17
16.2.2.1	LightCycler® 480 Instrument II .....	17
16.2.2.2	Arbeitsablauf mit dem MGISP-960 und dem LightCycler® 480 Instrument II .....	18
16.2.3	Analytische Spezifität .....	20
16.2.4	<i>In-silico</i> -Analyse .....	21
16.2.5	Inklusivität .....	21

16.2.6	Potentielle Störstoffe .....	21
17	Kundenservice und technischer Support.....	21
18	Literaturhinweise.....	22
19	Anhang 1: LightCycler® 480 Instrument II .....	23
19.1	Programmierung des LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	23
19.2	Einrichten einer Makro-Vorlage für das LightCycler® 480 Instrument II.....	28
19.3	Colour Compensation (Farbkompensation) für LightCycler® 480 Instrument II.....	35
19.4	Interpretation der Ergebnisse .....	35
20	Anhang 2: Bio-Rad CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ und Real-Time PCR System.....	37
20.1	Programmierung des CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-Systems (CFX96 Dx, CFX96 Touch).....	37
20.2	Auswertung der Ergebnisse anhand der On-Board-Software CFX.....	40
20.3	Exportieren von Ergebnissen der On-Board-Analyse .....	43
20.4	Interpretation der Ergebnisse mit der PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX) Analysesoftware .....	45
21	Anhang A: Ergebnisinterpretation .....	46
21.2	Device set up (Geräteeinrichtung) (neuer Benutzer oder Gerät) .....	47
21.2.1	Colour Compensation (Farbkompensation).....	47
21.3	Assay-Plugin (neuer Benutzer).....	48
21.4	Sample Name (Probenname).....	48
21.5	Hinzufügen von Lot (Charge)-Nummern des Gemischs .....	49
21.6	Analyse .....	49
21.7	Ergebnisse .....	50
21.8	Referenzkurve.....	50
21.9	Übersicht der Ergebnisse .....	51
21.10	Exportieren von Ergebnissen .....	52
22	Glossar.....	53

## 1 Produktbeschreibung

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit ist ein in einem einzigen Well ablaufender qPCR-Multiplex für den Nachweis des schweren akuten respiratorischen Syndroms Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Der Assay liefert 3 Ablesewerte. Ablesewert 1 zeigt das Vorliegen bzw. die Abwesenheit von SARS-CoV-2 durch Nachweis des Open Reading Frame-Gens (ORF1ab) an, Ablesewert 2 zeigt das Vorliegen bzw. die Abwesenheit von SARS-CoV-2 durch Nachweis des RdRp-Gens (RNA-abhängige RNA-Polymerase) an, Ablesewert 3 ist eine interne RNA-Kontrolle (IC) zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Inhibition. Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit verwendet **PlexZyme**<sup>®</sup>-Technologie, um seine Spezifität und überlegene Multiplexfähigkeit zu erzielen.

Dieser Assay wurde an Proben validiert, die mit dem MagNA Pure 96 System (Roche), dem PurePrep 96 (Molgen) und dem KingFisher™ Flex Sample Purification System (ThermoFisher) extrahiert wurden; sowie durch Liquid Handling mit dem **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX), und der Echtzeitdetektion auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument (LC480 II, Roche), dem CFX96™ Dx Real-Time PCR Detection System (CFX96 Dx, Bio-Rad), und dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (CFX96 Touch, Bio-Rad).

## 2 Verwendungszweck

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Kit ist ein *in-vitro*-diagnostischer Reverse-Transkriptase-Echtzeit-PCR-Test (RT-qPCR) für den qualitativen Nachweis von SARS-CoV-2.

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit dient der Unterstützung bei der Diagnose von SARS-CoV-2 und sollte in Verbindung mit klinischen und anderen Laborinformationen verwendet werden.

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit kann nur mit Nasopharyngealabstrichen als Probentyp verwendet werden.

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit ist zur Verwendung im professionellen Bereich, z. B. in Krankenhäusern, Referenz- oder staatlichen Labors, bestimmt. Er ist nicht für Selbsttests oder zur Verwendung in der häuslichen Umgebung oder am Krankenbett bestimmt.

Die Zielgruppe für das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit sind symptomatische Patienten, bei denen aufgrund der klinischen Symptome bzw. der Anamnese der Verdacht auf eine Infektion durch das mit dem schwerwiegenden akuten respiratorischen Syndrom assoziierte Coronavirus (SARS-CoV2) von ihrem Arzt geäußert wurde.

## 3 Informationen zu Pathogenen

Ein Ausbruch einer Atemwegserkrankung unbekannter Ätiologie in der Stadt Wuhan, Provinz Hubei, China, wurde der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erstmals am 31. Dezember 2019 gemeldet.<sup>1</sup> In der Folge wurde ein neuartiges Coronavirus identifiziert und als SARS-CoV-2 (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2) bezeichnet, das die übertragbare Krankheit COVID-19 (Coronavirus-Krankheit 2019) verursacht.<sup>2</sup> SARS-CoV-2 ist seitdem für eine globale Pandemie verantwortlich, die bis Ende September 2020 zu über 75 Millionen bestätigten Fällen und mehr als 1,5 Millionen Todesfällen führte.<sup>3</sup>

## 4 Kitinhalt

Anzahl der Tests: 384 Reaktionen

Tabelle 1. Kitinhalt für <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (Bestell-Nr. 1301384)			
Farbe des Deckels	Inhalt	Beschreibung	Menge
Braun	SARS-CoV-2 Mix (SARS-CoV-2-Gemisch), 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden <sup>^</sup> zur Amplifikation und zum Nachweis von SARS-CoV-2 und für die Internal Control (Interne Kontrolle) für LC480 II und CFX	2 x 150 µL
Grün	<b>Plex</b> Mastermix ( <b>Plex</b> Mastergemisch), 2x	Mastergemisch mit für die qPCR erforderlichen Komponenten einschließlich dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , DNA-Polymerase und Puffer	2 x 1,2 mL
Neutral	RTase, 100x	Reverse Transkriptase-Enzym zur Erzeugung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA-Vorlage	1 x 90 µL
Schwarz	RNase Inhibitor (RNase-Hemmer), 50x	RNase-Hemmer	1 x 135 µL
Violett	Internal Control (Interne Kontrolle) RNA <sup>#</sup>	Interne Kontrollzellen mit dem RNA-Template für die interne Kontrolle zur Überwachung der Effizienz von Extraktion, reverser Transkription und Amplifikation	1 x 200 µL
Blau	Nuclease Free Water (Nuklease-freies Wasser)	Wasser von PCR-Qualität	1 x 1 mL

<sup>#</sup> Die Template-Röhrchen sind von den Oligo-Gemischen getrennt, d. h. dem Raum zur Behandlung von Templates oder Nukleinsäuren, zu lagern

<sup>^</sup> Oligonukleotide sind PCR-Primer-Paare, **PlexZyme**<sup>®</sup>-Enzyme und fluoreszierende Sonden

\* Ausreichend für 384 x 10 µL Tests. Zusätzliches geliefertes Volumen für Kompatibilität mit Liquid-Handling-Instrumenten, validiert mit **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX).

## 5 Versand und Lagerung

- Die Komponenten des **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kits werden für den Versand auf Trockeneis/Eisgelpacks gelagert. Alle Komponenten sollten nach Erhalt zwischen -25 °C und -15 °C gelagert werden. Einfrier-/Auftauzyklen sollten auf 10 beschränkt werden.
- Bei Lagerung unter den empfohlenen Bedingungen und sachgemäßer Handhabung bleibt die Aktivität des Kits bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum erhalten. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

## 6 Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

### 6.1 Allgemein

- Nur für die Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Lesen Sie diese Gebrauchsanweisung vor dem Gebrauch sorgfältig durch. Befolgen Sie die beschriebenen Verfahren genau, um die Zuverlässigkeit der Testergebnisse zu gewährleisten. Jegliche Abweichung von diesen Verfahren kann die Testleistung beeinträchtigen.
- Die Benutzer müssen angemessen in der Verwendung des **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assays geschult werden.
- Jedes schwerwiegende Vorkommnis muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem der Benutzer und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

### 6.2 Labor

- Es wird empfohlen, Probenvorbereitung/-extraktion, Mastermix-Vorbereitung, Probenzugabe und Temperaturzyklen in räumlich getrennten Bereichen durchzuführen. Das PCR-Instrument sollte sich am besten in einem anderen Raum befinden als die Bereiche, in denen die Reaktionen vorbereitet werden.
- Es wird empfohlen, die im Labor üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Tragen Sie beim Umgang mit Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel.
- In klinischen Proben können Krankheitserreger vorhanden sein. Behandeln Sie alle biologischen Proben als potenziell infektiös und befolgen Sie die Sicherheitsvorschriften Ihrer Einrichtung für die Handhabung von Chemikalien und biologischen Proben.
- Befolgen Sie die Entsorgungsvorschriften Ihrer Einrichtung für gefährliche Abfälle zur ordnungsgemäßen Entsorgung von Proben, Reagenzien und anderen potenziell kontaminierten Materialien.

### 6.3 Probenhandhabung

- Proben sollten unter Anwendung von Standardlabortechniken oder gemäß den Anweisungen im Entnahmekit entnommen, transportiert und gelagert werden.

### 6.4 Assay

- Grundlegende Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination von PCR-Reaktionen sind unter anderem die Verwendung von sterilen Filterpipettenspitzen, die Verwendung einer neuen Pipettenspitze für jeden Pipettiervorgang und die Trennung der Arbeitsabläufe.
- PCR-Tests sind anfällig für Kontaminationen durch frühere PCR-Produkte. Öffnen Sie die Reaktionsgefäße niemals nach Abschluss der PCR.

### 6.5 Sicherheitsvorkehrungen

- Sicherheitsdatenblätter (SDB) sind auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

### 6.6 Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für das Assay-Plugin

- Die SpeedX-Software kann die Analyse der mit dem Test-Kit erzeugten Rohdaten nur steuern, wenn sie mit dem entsprechenden PCR-Instrument verwendet wird. Sie hat keine Kontrolle über die Vorbereitung der Proben, die Reaktionen, die Programmierung der Geräte oder die Durchführung der Behandlung.
- Die Benutzer sollten in der Verwendung der Analysesoftware angemessen geschult werden, und der Zugriff sollte auf zugewiesene Einzelbenutzer beschränkt sein.
- Es wird empfohlen, eine Benutzerauthentifizierung und Cyber-Sicherheitskontrollen, wie Antiviren-Software oder eine Firewall innerhalb der IT-Infrastruktur und des IT-Systems, in der die Software eingesetzt wird, zu implementieren.

- Bei Feststellung eines Cybersicherheitsvorfalls, wie z. B. unbefugtem Zugriff oder Ransomware-Attacken, wenden Sie sich für weitere Unterstützung bitte an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

## 7 Erforderliches, jedoch nicht mitgeliefertes Material

### Material für die Positivkontrolle

- REDx™ FLOQ-Positivkontrolle für SARS-CoV-2-Abstrich (Microbix, Kat.-Nr. RED-S-19-01)

### Allgemeines Labor-Verbrauchsmaterial

- Handschuhe und saubere Laborkittel
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge für 0,5-mL- und 1,5-mL-Röhrchen
- Mikropipetten
- Mehrkanalpipetten
- Sterile Aerosol-resistente Pipettenspitzen
- 0,5-mL-Röhrchen und 1,5-mL-Röhrchen (PCR-grade)
- Klebende Plattendichtung
- 2,0-mL-Röhrchen (für die Vorverdünnung der internen Kontrollzellen)

### Für das MagNA Pure 96 Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Roche, Bestell-Nr. 00374905001)
- MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit (Roche, Bestell-Nr. 06543588001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (extern) (Roche, Bestell-Nr. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, Bestell-Nr. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000uL (Roche, Bestell-Nr. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, Bestell-Nr. 06241611001)
- MagNA Pure 96 Sealing Foil (Roche, Bestell-Nr. 06241638001)

### Für das Instrument MGISP-960

- Nukleinsäure-Extraktionskit 96 Prep (MGI, Kat. Nr. 1000022201(ARTG-IVD)) oder Nukleinsäure-Extraktionskit 96 Prep (MGI, Kat. Nr.1000021042 (CE-IVD))
- 4 x 250 µL automatische Filterspitzen (MGI, Kat. Nr. 1000000723)
- 5 x 1,3 mL U-Boden Deep-Well-Platte (MGI, Kat. Nr. 1000004644)
- 1 x Dünnwandige Hartschalen-PCR-Platte mit 96 Wells, weiße Schale/transparente Wells (MGI, Kat. Nr. 1000012059)
- 50-mL-Röhrchen, DNase-frei, RNase-frei
- Reines Ethanol (100 %)
- Plattenzentrifuge

### Für das PurePrep 96 Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- Wasser in molekularer Qualität
- PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Molgen, Bestell-Nr. MG96020050)
- PurePrep 96 Elution plate 200 µL (Molgen, Bestell-Nr. MG96010050)
- PurePrep 96 Tip combs (Molgen, Bestell-Nr. MG96030050)
- Molgen PurePrep Pathogens 1x96 Kit (Molgen, Bestell-Nr. OE00290096) ODER 10x96 Kit (Molgen, Bestell-Nr. OE00290960)
- Mikroplattenschüttler (Mindestdrehzahl: 1000 U/min)
- 50 mL-Reagenzbehälter für 8-Kanal-Pipetten
- 50 mL Falcon-Röhrchen

*Für KingFisher Flex*

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- Thermofisher MagMAX Virus- und Pathogen-Nukleinsäure-Isolierungskit (Thermofisher, Bestellnr. A42352)
- KingFisher 96 Deep-Well-Platte, V-Boden, Polypropylen (Thermofisher, Bestellnr. 95040450)
- KingFisher 96 Spitzenkamm für Deep-Well-Magnete (Thermofisher, Bestellnr. 97002534)
- KingFisher 96 Mikroplatte (200 µL) (Thermofisher, Bestellnr. 97002540)
- 80 % Ethanol
- 50 mL-Reagenzbehälter für 8-Kanal-Pipetten
- 50 mL Falcon-Röhrchen

*Für SpeedX PlexPrep™ Liquid-Handling-Instrument*

- **PlexPrep™** 8-Positionen-Deck mit 2 unabhängigen Kanälen und einem 8-Sonden-Kopf (Teilenummer 6600200-01)
- 4x gerahmtes Gestell für Spitzen (Bestell-Nr. HMT-6600533-01)
- 4x Röhrchenmodul mit 24 Positionen (Bestell-Nr. HMT-6600555-01)
- 1x Modul für kleine Röhrchen mit 24 Positionen (Bestell-Nr. HMT6600409-01)
- 50µL leitfähige gefilterte Spitzen (Bestell-Nr. HMT-235948)
- 300µL leitfähige gefilterte Spitzen (Bestell-Nr. HMT-235903)
- 1000 µL leitfähige gefilterte Spitzen (Bestell-Nr. HMT-235905)

*Für das LightCycler® 480 Instrument II*

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) (Farbkompensations)-Kit (SpeedX, Bestell-Nr. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Multiwell-Platte 96) (Roche, Bestell-Nr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Multiwell-Platte 384) (Roche, Bestell-Nr. 04729749001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (Verschlussfolie) (Roche, Bestell-Nr. 04729757001)

*Für CFX96™ Dx Echtzeit-PCR-Nachweis und CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-Systeme*

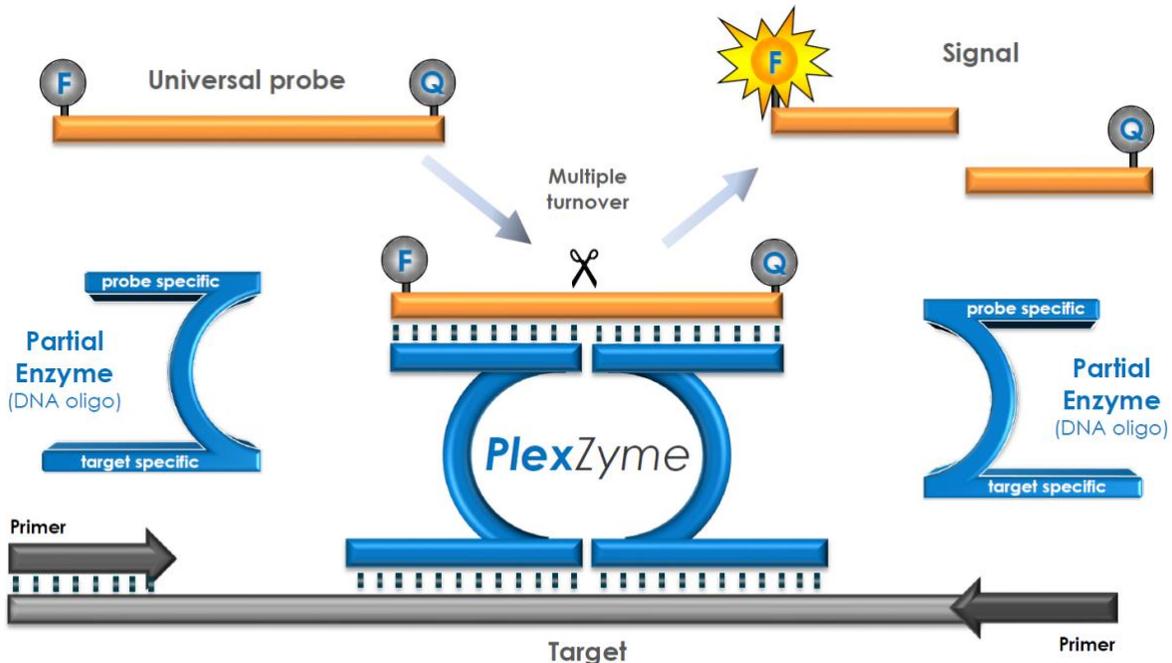
- Hard-Shell® 96-Well PCR-Platten, niedriges Profil, halbseitig umrandet, klar Schale/klar well (Bio-Rad, Bestell-Nr. HSL9901 oder HSL9601)
- Microseal® „B“ PCR Plate Sealing Film (Abdichtfolie für Platten), selbstklebend, optisch (Bio-rad, Bestell-Nr. MSB1001)

## 8 Prinzip der Technologie

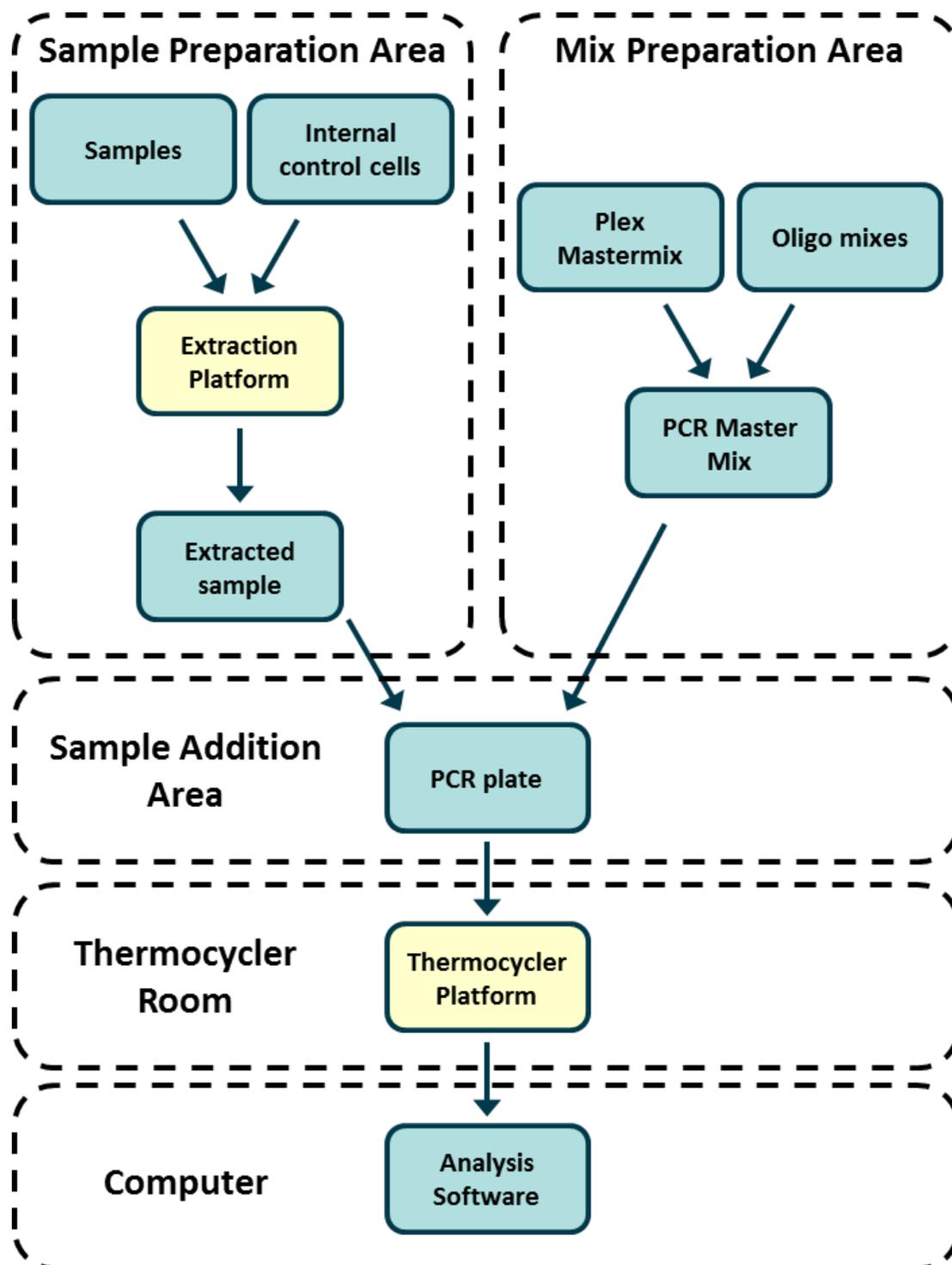
Mit der Realtime-PCR (qPCR) können spezifische Target-Nukleinsäuren von Pathogenen amplifiziert und nachgewiesen werden. **PlexPCR<sup>®</sup>** ist ein qPCR-Verfahren, das **PlexZyme<sup>®</sup>**-Enzyme verwendet, die das amplifizierte Produkt durch die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals erkennen und melden (**Abbildung 1**).

**PlexZyme<sup>®</sup>**-Enzyme sind Katalysator-DNA-Komplexe, die aus zwei DNA-Oligos bestehen, die als „Teilenzyme“ bezeichnet werden. Jedes Teilenzym verfügt über eine Target-spezifische Region, einen katalytischen Kern und eine universelle Sondenbindungsregion. Ist das Target-Produkt vorhanden, binden die beiden Teilenzyme nebeneinander an das Target-Produkt und bilden so das aktive **PlexZyme<sup>®</sup>**, das durch seine katalytische Aktivität eine markierte Sonde spaltet. Durch die Spaltung trennen sich Fluorophor und Quencher-Farbstoffe voneinander, wodurch ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird, das in Echtzeit beobachtet werden kann. **PlexZyme<sup>®</sup>**-Enzyme verfügen gegenüber alternativen Nachweistechnologien über eine höhere Spezifität, da für den Nachweis zwei Teilenzyme gebunden werden müssen. **PlexZyme<sup>®</sup>**-Enzyme sind außerdem mehrfach verwendbare Enzyme. In jedem PCR-Zyklus können mehrere Sonden gespalten werden, sodass ein starkes, empfindliches Signal erzeugt wird. **PlexZyme<sup>®</sup>**-Assays sind hoch sensitiv und spezifisch und ideal für den Multiplexnachweis von Pathogenen geeignet.

Abbildung 1. Schematische Darstellung der **PlexZyme<sup>®</sup>**-Detektion und der universellen Signalisierung



## 9 Verfahrensübersicht



## 10 Detaillierte Vorgehensweise

**Hinweis:** Die Namen der mitgelieferten Reagenzien sind kursiv gedruckt, die Farbe des Röhrchendeckels folgt in Klammern.

### 10.1 Probeentnahme, Transport und Lagerung

Eine unzureichende oder unsachgemäße Entnahme, Lagerung und Transport von Proben kann zu falschen Testergebnissen führen. Um die Qualität und Stabilität der Proben zu gewährleisten, wird eine entsprechende Schulung für die Probeentnahme dringend empfohlen.

Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers des Probenentnahmegärts zur ordnungsgemäßen Entnahme.

Vor der Anwendung eines Entnahmeverfahrens müssen geschulte Mitarbeiter sicherstellen, dass sie mit dem Probenentnahmegärät und der Methodik gut vertraut sind. Überprüfen Sie die Testbeschreibung zumindest auf folgende Punkte: Angabe des Probentyps, ausreichendes Volumen, Verfahren, erforderliche Entnahmematerialien, Patientenvorbereitung und Anweisungen zur ordnungsgemäßen Handhabung und Lagerung.

Die Entnahme und der Transport von nasopharyngealen Abstrichen sollte gemäß den Anweisungen des Extraktionskits erfolgen. Wir empfehlen, nasopharyngeale Abstriche sofort zu testen oder zwischen -25 °C und -15 °C zu lagern und während des Gebrauchs nicht öfter als dreimal einzufrieren und aufzutauen.

### 10.2 Probenbearbeitung

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit wurde für die folgenden in **Tabelle 2** genannten Extraktionsinstrumente validiert.

Eine Anleitung zur Verwendung der Internal Control (Internen Kontrolle) finden Sie in **Abschnitt 10.3**.

Anweisungen zur Verwendung des Kits zur Abstrich-Positivkontrolle REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 finden Sie in **Abschnitt 15**.

Tabelle 2. Validierte Extraktionsprotokolle				
Instrument	Extraktionskit	Probenvolumen	Protokoll	Elutionsvolumen
MagNA Pure 96 <sup>a b</sup>	MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL
MGISP-960 <sup>a b</sup>	Nukleinsäure-Extraktionskit	180 µL	MGISP-960 Automatisierte Extraktion, Standard-Arbeitsablauf	30 µL
KingFisher Flex <sup>a b</sup>	MagMAX Virus/Pathogen Nukleinsäure-Isolierungskit	200 µL	MVP_Flex_200 µL	50 µL
PurePrep 96 <sup>a b</sup>	PurePrep Pathogen-Kit	200 µL	PP v.3	50 µL

<sup>a</sup> Siehe Abschnitt 10.3.1 für Informationen zur Verwendung der Internal Control (internen Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96, KingFisher Flex und PurePrep 96

<sup>b</sup> Proben sollten innerhalb von 30 Minuten nach der Extraktion in das Mastergemisch gegeben werden

## 10.2.1 Reagenzvolumen für MGISP-960

Tabelle 3. MGISP-960 Reagenzvolumen pro Probe		
Reagenz	Volumen pro Probe	Platte
Puffer MLB	160 µL	U-Boden Deep-Well-Platte (vorbereitete Puffermischung)
Reines Ethanol*	200 µL	U-Boden Deep-Well-Platte (vorbereitete Puffermischung)
Magnetic Beads M	15 µL	U-Boden Deep-Well-Platte (vorbereitete Puffermischung)
Verstärker-Puffer	1 µL	U-Boden Deep-Well-Platte (vorbereitete Puffermischung)
RNase-freies Wasser	15 µL	U-Boden Deep-Well-Platte (vorbereitete Puffermischung)
RNase-freies Wasser	50 µL	U-Boden Deep-Well-Platte
Puffer MW1	170 µL	U-Boden Deep-Well-Platte
Puffer MW2	340 µL	U-Boden Deep-Well-Platte

\* Nicht im Lieferumfang enthalten

## 10.2.2 Reagenzvolumen für KingFisher Flex und PurePrep

Tabelle 4. KingFisher Reagenzvolumen		
Reagenz	Volumen pro Probe	Platte
MagMax Bindungslösung	265 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte (Probenplatte)
MagMax Bindungskügelchen für gesamte Nukleinsäure	10 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte (Probenplatte)
MagMax Proteinase K	5 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte (Probenplatte)
MagMax Waschpuffer	500 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte
Waschlösung 2* (80 % Ethanol)	500 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte
Waschlösung 3* (80 % Ethanol)	250 µL	KingFisher 96 Deep-Well-Platte
MagMax Elutionslösung	50 µL	KingFisher 96 Mikroplatte 200 µL

\* Nicht im Lieferumfang enthalten

Tabelle 5. PurePrep 96 Reagenzvolumen		
Reagenz	Volumen pro Probe	Platte
Molgen Lysepuffer PA1	200 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Probenplatte)
Molgene Poly-A-RNA 2,5-mg/mL-Lösung	1 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Probenplatte)
Molgen Proteinase K 20 mg/mL-Lösung	10 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Probenplatte)
Molgen MagSi-PA VII (Magnetische Kügelchen)	20 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Probenplatte)
Molgen Bindungspuffer U1	400 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL (Probenplatte)
Molgen Waschpuffer I	800 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL
Molgen Waschpuffer I	800 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL
Molgen Waschpuffer II	800 µL	PurePrep Deep-Well-Platte 2 mL
Molgen Elutionspuffer	50 µL	PurePrep 96 Elutionsplatte 200 µL

### 10.3 Internal Control (Interne Kontrolle) (IC)

Das Kit enthält eine interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Hemmung. Der Assay für die interne Kontrolle ist im Assay-Gemisch enthalten und amplifiziert die *Internal Control RNA* (**VIOLETT**). Die *Internal Control RNA* wird verdünnt und wie nachfolgend beschrieben für das jeweilige Extraktionsinstrument bearbeitet. Das Template der internen Kontrolle wird daher mit der Probe mitextrahiert und in der Reaktion mitamplifiziert.

#### 10.3.1 Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96, KingFisher Flex und PurePrep 96

Verdünnen Sie die *Internal Control RNA* (**VIOLETT**) im Verhältnis 1 zu 100 in 1x PBS (**Tabelle 6**). Passen Sie ggf. das Volumen mit demselben Verdünnungsfaktor an (das Mindestvolumen für die erforderliche Probenanzahl finden Sie im Handbuch zum Extraktionskit). Die verdünnte Internal Control RNA wird in das Internal Control Tube (Röhrchen für die interne Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96 geladen. 20 µL werden jeder Probe automatisch zugesetzt (Standard). Für Extraktionen auf dem PurePrep 96 und KingFisher werden 20 µL der verdünnten internen Kontroll-RNA manuell auf die Probenplatte gegeben.

**Hinweis:** Verdünnte Internal Control RNA darf NICHT gelagert werden

Tabelle 6. Verdünnung von Internal Control RNA für das MagNA Pure 96 (Verdünnung 1 zu 100)			
Internal Control RNA ( <b>VIOLETT</b> ) (µL)	1x PBS (µL)	Gesamtvolumen (µL)	Der Probe zugesetztes Volumen (µL)
36	3564	3600	20

### 10.4 Vorbereitung der Echtzeit-PCR

**Hinweis:** Tauen Sie die Reagenzien vor Gebrauch vollständig auf und vermischen Sie sie gründlich durch kurzes Vortexen.

Das *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2Kit wird mit einem Endvolumen von 10 µL in 96-Well- oder 384-Well-Platten auf dem LC480 II getestet; ein Endvolumen von 10 µL in 96-Well-Platten auf dem CFX96 Dx und CFX96 Touch. Das *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit hat einen geeigneten Totraum für die Verwendung mit Liquid-Handling-Systemen und wurde mit dem SpeedX *PlexPrep*<sup>™</sup> validiert. Wenden Sie sich an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au), um Unterstützung bei den Protokollen zu erhalten.

Siehe **Tabelle 1** – für eine Beschreibung des Kitinhalts.

#### 10.4.1 Vorbereitung des Mastergemisches

- Für ein Reaktionsvolumen von 10 µL sind 7,5 µL Mastergemisch und 2,5 µL Extrakt erforderlich. Bereiten Sie das Mastergemisch wie in **Tabelle 7** dargestellt zu. Pipettieren Sie das Mastergemisch in die PCR-Platte und geben Sie anschließend der Reaktion die extrahierte Probe zu.
- Auf jeder Platte müssen Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt werden.
- Verschließen Sie die Platte mit der Klebefolie, zentrifugieren Sie sie und überführen Sie sie in den Thermocycler.

Tabelle 7. Mastergemisch		
Reagenz	Konzentration	Volumen pro 10-µL-Reaktion (µL)
Nuclease Free Water (Nuklease-freies Wasser) ( <b>BLAU</b> )	n. zutr.	1,7
<i>Plex</i> Mastergemisch ( <b>GRÜN</b> )	2x	5,0
SARS-CoV-2-Gemisch ( <b>BRAUN</b> )	20x	0,5
RTase ( <b>NEUTRAL</b> )	100x	0,1
RNase-Hemmer ( <b>SCHWARZ</b> )	50x	0,2
Gesamtvolumen (µL)		7,5
2,5 µL Probe für ein Endvolumen von 10 µL zugeben		

## 11 Programmierung und Analyse

Einzelheiten zur Programmierung und Auswertung finden Sie in den **Abschnitten 19-21**.

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit verfügt über 3 Kanäle zum Nachweis von SARS-CoV-2 über die Gene Open Reading Frame (ORF1ab) und RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) sowie die interne Kontrolle (**Tabelle 8**).

Tabelle 8. Kanäle für die <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Targets			
qPCR-Instrument	ORF1ab	RdRp-Gen	Internal Control (interner Kontrolle)
LC480 II	465-510	533-580	533-610
CFX96 Dx & CFX96 Touch	FAM	HEX	Texas Red

## 12 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Daten kann mit der LC480 II On-Board-Software, der CFX96<sup>™</sup> Dx und CFX96<sup>™</sup> Touch On-Board-Software oder der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Analysesoftware erfolgen. Die **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Analysesoftware automatisiert die Auswertung der Amplifikationsergebnisse und optimiert den Arbeitsablauf. Anweisungen zur Verwendung der Analysesoftware finden Sie in **Abschnitt 21**.

Informationen zu geeigneter Analysesoftware für jedes Realtime-PCR-Instrument finden Sie in **Tabelle 9**. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabelle 9. <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Analysesoftware		
Best.-Nr.	Analysesoftware*	Realtime-PCR-Instrument
99021	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx & CFX96 Touch

\* Beachten Sie die Informationen auf der Website <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/>, um sicherzustellen, dass Sie die neueste Version der Analysesoftware verwenden.

## 13 Einschränkungen

- Der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay darf nur von Personal durchgeführt werden, das in dem Verfahren geschult ist, und muss gemäß der Gebrauchsanweisung durchgeführt werden.
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, müssen Proben angemessen entnommen, transportiert, gelagert und verarbeitet werden. Die Nichtbeachtung der Anweisungen für jeden dieser Schritte kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay ist ein qualitativer Assay, der KEINE quantitativen Werte oder Informationen zur Belastung des Organismus liefert.
- Die Testergebnisse müssen mit der Krankengeschichte, den epidemiologischen Daten, den Labordaten und allen anderen Daten, die dem Kliniker zur Verfügung stehen, korreliert werden.
- Die Prävalenz von viralen Targets beeinflusst die positiven und negativen Vorhersagewerte für den Assay.
- Negative Ergebnisse schließen die Möglichkeit einer Infektion nicht aus, da eine unsachgemäße Probenentnahme, ein technischer Fehler, das Vorhandensein von Inhibitoren, Verwechslungen oder eine geringe Anzahl von Organismen in der klinischen Probe vorliegen können.
- Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer Kreuzkontamination durch Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder amplifizierte Produkte entstehen.

Klinische Proben mit einem Cq-Wert < 3 liefern möglicherweise kein gültiges Ergebnis. Diese Proben werden von der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Analysesoftware mit der folgenden Meldung gekennzeichnet: „Fehler: Abnormale Veränderung des Fluoreszenzniveaus“. Dies ist ein Hinweis auf eine hoch belastete SARS-CoV-2-Probe oberhalb der Nachweisgrenze. Solche Proben sollten verdünnt und wiederholt werden.

Diese Proben werden außerdem bei der Analyse mit der On-Board-Software LC480 II mit folgender Meldung gekennzeichnet: „Einige Proben überschreiten den Noise-Band-Wert im Bereich der Hintergrundberechnung“. Dies ist ein Hinweis auf eine hoch belastete SARS-CoV-2-Probe oberhalb der Nachweisgrenze. Solche Proben sollten verdünnt und wiederholt werden.

Klinische Proben können ungültig erscheinen, wenn sie eine hohe Viruslast aufweisen. Dies wird von der integrierten CFX-Software nicht erkannt, sodass der Benutzer alle Kurven überprüfen muss, bevor er fortfährt. Wenn eine hoch belastete SARS-CoV-2-Probe die Nachweisgrenze überschreitet, sollten die Proben verdünnt und wiederholt werden.

## 14 Qualitätskontrolle

Das **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit enthält eine Internal Control (interne Kontrolle) zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Hemmung (**Abschnitt 10.3**).

Die Abstrich-Positivkontrolle REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 (Microbix, Best.-Nr. RED-S-19-01) wird als positives Kontrollmaterial für die Nukleinsäureamplifikation empfohlen. Anweisungen zur Verwendung der Abstrich-Positivkontrolle REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 finden Sie in **Abschnitt 15**. Es wird empfohlen, eine bekannt negative Probe als Negativkontrolle zu verwenden.

## 15 Anweisungen für REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2-Positivkontrollen

Die Abstrich-Positivkontrolle REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 (Microbix, Best.-Nr. RED-S-19-01) enthält positives Kontrollmaterial für SARS-CoV-2.

Die REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2-Positivkontrollen sollten bis zur Verwendung bei 2-8 °C gelagert werden. Nach dem Öffnen sollte die REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2-Positivkontrolle nicht wiederverwendet werden.

Weitere Informationen zur Lagerung und zu Einschränkungen finden Sie in der Packungsbeilage der REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2-Positivkontrolle.

### 15.1 Gebrauchsanweisung

Verdünnen Sie die REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2-Positivkontrolle in 3 mL Universal Transport Media (UTM) oder Viral Transport Media (VTM).

Bereiten Sie die qPCR-Reaktion wie in **Abschnitt 10.4** beschrieben unter Verwendung einer Positivkontrolle als Probe vor.

## 16 Leistungsmerkmale

### 16.1 Klinische Leistung

#### 16.1.1 Klinische Studie 1

Am Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory (QPID), South Brisbane, QLD, Australien wurde eine retrospektive klinische Studie an archivierten Nasopharyngeal-Abstrichproben (n=165) durchgeführt, die zuvor mit dem Abbott m2000 SARS-CoV-2-Assay getestet worden waren. Die Proben wurden auf der MagNA Pure 96 (Roche) Extraktionsplattform unter Verwendung des Pathogen Universal 200 Protokolls extrahiert. 200 µL von Proben wurden extrahiert und in 50 µL eluiert. Die Proben wurden mit dem **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kit in 10 µL-Reaktionen auf dem LightCycler 480 II getestet.

Als Referenzmethode für den **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay wurde der Ansatz eines zusammengesetzten Referenzergebnisses verwendet. Die Ergebnisse von zwei validierten SARS-CoV-2 PCR-Assays (Abbott m2000 SARS-CoV-2-Assay und Echtzeit fluoreszierendes RT-PCR-Kit zur Entdeckung von SARS-CoV-2 (BGI)) wurden analysiert und die Proben ergaben in den beiden Assays übereinstimmende, als SARS-CoV-2 positiv oder negativ betrachtete Ergebnisse. Der SARS-CoV-2-Status von Proben, die zwischen den Vergleichstests abweichende Ergebnisse zeigten (n=22), konnte nicht definitiv festgestellt werden und diese Proben wurden aus der Endanalyse ausgeschlossen. Die positive und negative Prozentübereinstimmung zwischen **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 und der zusammengesetzten Referenz wird in **Tabelle 10** gezeigt.

Tabelle 10. Klinische Bewertung des <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Kits			
		Zusammengesetztes Referenzergebnis (n=142)	
		SARS-CoV-2	
		Positiv	Negativ
<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 <sup>1</sup>	Positiv	83	2
	Negativ	6	51
<b>Positive Prozentuale Übereinstimmung (PPA)</b>		93,26 % (95 % CI 85,90 – 97,49 %)	
<b>Negative Prozentuale Übereinstimmung (NPA)</b>		96,23 % (95 % CI 87,02 – 99,54 %)	
<b>Gesamtübereinstimmungsrate (ORA)</b>		94,37 % (95 % CI 89,20 – 97,54 %)	

<sup>1</sup>Eine Probe war beim **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay wiederholt ungültig und konnte nicht evaluiert werden.

### 16.2 Analytische Leistung

#### 16.2.1 Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

##### 16.2.1.1 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

Für den **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay wurde eine Reproduzierbarkeitsstudie für verschiedene Chargen, Bediener, Tage und LightCycler<sup>®</sup> 480 II-Instrumente durchgeführt, wobei Panels verwendet wurden, die in gepoolten negativen klinischen nasopharyngealen Abstrichen vorbereitet wurden, die mithilfe von Virustransportmedien (VTM) gesammelt wurden. Panel-Elemente bestanden aus dem Referenzmaterial SARS-CoV-2 Stamm USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATtrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, Kat.-Nr. NATSARS(COV2)-ST), das in negative nasopharyngeale Abstriche, die in VTM gesammelt wurden, bei 5x LOD (LOD, Limit of Detection / Erkennungsgrenze), 50x LOD und 100x LOD eingesetzt wurde. Jedes Panel enthielt sechs Replikate dieser Panel-Elemente.

Die Tests wurden mit zwei verschiedenen Chargen des **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Gemisches durchgeführt. Die Panels wurden zweimal täglich an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen von zwei Bedienern getestet, was insgesamt 36 Beobachtungen pro Panel-Element ergab (6 Wiederholungen x 2 Durchläufe x 3 Tage x 1 Messort = 36 Beobachtungen).

Die Wiederholbarkeit zwischen den Chargen, zwischen den Tagen, zwischen den Geräten, zwischen den Bedienern und die gesamte Reproduzierbarkeit wurden bewertet. Die prozentuale Übereinstimmung wurde für jedes Panel-Element auf der Grundlage des erwarteten Ergebnisses in der SARS-CoV-2-Nachweiskomponente des Assays berechnet. Der prozentuale Variationskoeffizient (%CV) wurde aus dem für den SARS-CoV-2-Nachweis angegebenen Zyklusquantifizierungswert (C<sub>q</sub>) berechnet. Die Ergebnisse des Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitstests sind in **Tabelle 11** dargestellt.

**Tabelle 11. Wiederholbarkeit/Reproduzierbarkeit der SARS-CoV-2-Nachweiskomponente des PlexPCR® SARS-CoV-2-Assays auf dem LightCycler® 480 Instrument II**

SARS-CoV-2 – ORF1ab										
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Gesamt	
Panel-Element	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	36	18,6	0,52	2,8	0,31	1,7	0,51	2,7	0,5	2,7
50x LOD	36	19,4	0,53	2,7	0,28	1,5	0,58	3	0,52	2,7
5x LOD	36	22,6	0,91	4	0,53	2,3	0,84	3,7	0,98	4,3
SARS-CoV-2 – RdRp										
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Gesamt	
Proben-ID	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	36	19,1	0,4	2,1	0,24	1,3	0,31	1,6	0,36	1,9
50x LOD	36	19,9	0,41	2,1	0,19	1	0,36	1,8	0,36	1,8
5x LOD	36	23,2	0,51	2,2	0,31	1,3	0,39	1,7	0,57	2,5
Internal Control (interner Kontrolle)										
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Gesamt	
Proben-ID	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	36	19,3	0,36	1,9	0,45	2,3	0,3	1,6	0,51	2,6
50x LOD	36	19,5	0,42	2,2	0,41	2,1	0,4	1,8	0,52	2,7
5x LOD	36	19,5	0,67	3,4	0,54	2,7	0,5	2,2	0,69	3,4
Negativ	36	20,4	0,35	1,7	0,93	4,6	0,2	0,8	0,89	4,4

#### 16.2.1.2 Für CFX96™ Dx Echtzeit-PCR-Nachweis und CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-Systeme

Eine Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsstudie wurde über Chargen, Bediener, Tage und Läufe hinweg auf CFX96™ Touch Echtzeit-PCR-Nachweis-Systemen für den PlexPCR® SARS-CoV-2 Assay durchgeführt, wobei Panels verwendet wurden, die in gepoolten negativen klinischen nasopharyngealen Abstrichen vorbereitet wurden, die mithilfe von Virustransportmedien (VTM) gesammelt wurden. Panel-Elemente bestanden aus dem Referenzmaterial SARS-CoV-2 Stamm USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol™ SARS-CoV-2 Stock, Kat.-Nr. NATSARS(COV2)-ST), das in negative nasopharyngale Abstriche, die in VTM gesammelt wurden, bei 5x LOD (LOD, Limit of Detection / Erkennungsgrenze), 50x LOD und 100x LOD eingesetzt wurde. Jedes Panel enthielt sechs Replikate dieser Panel-Elemente.

Die Tests wurden mit zwei verschiedenen Chargen des PlexPCR® SARS-CoV-2-Gemisches durchgeführt. Die Panels wurden dreimal täglich an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen von zwei Bedienern getestet, was insgesamt 108 Beobachtungen pro Panel-Element ergab.

Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Durchlaufs, zwischen den Läufen, zwischen den Chargen, zwischen den Bedienern, zwischen den Geräten und die Gesamtreproduzierbarkeit wurden bewertet. Die prozentuale Übereinstimmung wurde für jedes Panel-Element auf der Grundlage des erwarteten Ergebnisses in der SARS-CoV-2-Nachweiskomponente des Assays berechnet. Der prozentuale Variationskoeffizient (%CV) wurde aus dem für den SARS-CoV-2-Nachweis angegebenen Zyklusquantifizierungswert (C<sub>q</sub>) berechnet. Die Ergebnisse des Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitstests sind in **Tabelle 12** dargestellt.

**Tabelle 12. Wiederholbarkeit/Reproduzierbarkeit der SARS-CoV-2-Detektionskomponente des PlexPCR® SARS-CoV-2-Assays auf dem CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-System**

SARS-CoV-2 – ORF1ab														
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Zwischen Bediener		Zwischen Instrumenten		Gesamt	
Panel-Element	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	108	19,18	0,27	1,5	0,41	2,2	0,65	3,4	0,85	4,4	0,17	0,9	1,14	5,9
50x LOD	108	20,20	0,05	0,2	0,42	2,1	0,67	3,3	0,82	4,0	0,13	0,6	1,18	5,9
5x LOD	108	22,78	0,37	1,7	0,45	2,0	0,41	1,8	0,72	3,2	0,28	1,2	1,19	5,2
SARS-CoV-2 – RdRp														
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Zwischen Bediener		Zwischen Instrumenten		Gesamt	
Proben-ID	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	108	19,80	0,12	0,6	0,35	1,8	0,63	3,2	0,85	4,3	0,16	0,8	1,15	5,8
50x LOD	108	20,73	0,22	1,1	0,22	1,1	0,67	3,2	0,85	4,1	0,18	0,9	1,23	5,9
5x LOD	108	23,18	0,39	1,7	0,24	1,0	0,53	2,3	0,61	2,6	0,07	0,3	1,09	4,7
Internal Control (interner Kontrolle)														
			Innerhalb eines Durchlaufs		Zwischen Durchläufen		Zwischen Chargen		Zwischen Bediener		Zwischen Instrumenten		Gesamt	
Proben-ID	N	Mittlerer C <sub>q</sub>	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%	SD	VK%
100x LOD	108	20,34	0,24	1,2	0,51	2,5	0,28	1,4	0,23	1,1	0,06	0,3	0,79	3,9
50x LOD	108	20,75	0,29	1,4	0,75	3,6	0,20	0,9	0,18	0,9	0,01	0,0	0,74	3,6
5x LOD	108	20,98	0,26	1,2	0,76	3,6	0,11	0,5	0,12	0,6	0,05	0,2	0,69	3,3
Negativ	108	21,32	0,22	1,0	0,80	3,7	0,10	0,4	0,14	0,6	0,04	0,2	1,01	4,8

## 16.2.2 Analytische Sensitivität

### 16.2.2.1 LightCycler® 480 Instrument II

Der SARS-CoV-2-Stamm USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATtrol™ SARS-CoV-2 Stock, Best.-Nr. NATSARS(COV2)-ST) wurde als repräsentativer Stamm zur Beurteilung der Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) des **PlexPCR®** SARS-CoV-2-Assays verwendet. Quantitative Präparate aus positivem Referenzmaterial von SARS-CoV-2 wurden seriell in negative Nasopharyngealabstriche in Virustransportmedien (VTM) verdünnt. Insgesamt wurden 7 Konzentrationsstufen über mehrere Tage unter Verwendung von 2 unabhängigen Chargen von **PlexPCR®** SARS-CoV-2-Assay-Reagenzien für insgesamt 40 Replikate pro Konzentration getestet. Die Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) wurde mittels logistischer Regressionsanalyse (Probit-Modell) als die niedrigste Konzentration (ausgedrückt als Kopien/mL) bestimmt, die mindestens ≥ 95 % positive Replikate erzeugt.

Der LoD-Wert (ermittelt aus den in **Tabelle 13** gezeigten Daten) betrug 360 Kopien/mL (95 % CI: 565,69 - 1193,50 Kopien/mL).

Tabelle 13. LoD des *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Assays<sup>†</sup>

Positives Referenzmaterial	Stamm	SARS-CoV-2-Konz. (Genome pro mL)	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Ergebnis		
			Positiv	Gesamt	% Positiv
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	2500	40	40	100,00
		1875	40	40	100,00
		1250	40	40	100,00
		625	36	40	90,00
		313	27	38*	71,05
		156	22	40	55,00
		78	10	40	25,00

<sup>†</sup> Mit den Systemen CFX96 wurde eine gleichwertige analytische Empfindlichkeit erzielt

\* Für die Konzentration von 312,5 Kopien/mL wurden 2 Replikate von der Analysesoftware aufgrund eines IC-Ausfalls als ungültig gemeldet und daher von der Analyse ausgeschlossen.

#### 16.2.2.2 Arbeitsablauf mit dem MGISP-960 und dem LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

Im Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory (QPID), South Brisbane, QLD, wurde eine Studie durchgeführt, um nachzuweisen, dass die analytische Leistung des *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Tests bei der Extraktion von Proben unter Verwendung des MGISP-960-Geräts (MGI) mit dem MGIEasy Nukleinsäure-Extraktionskit (PID: 1000020471; MGI) gleichwertig mit der analytischen Leistung des Assays ist, wenn die Proben mit dem MagNa Pure 96 (MP96) Gerät (Roche) mit dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (PID: 06543588001; Roche) extrahiert werden. Das negative Referenzmaterial bestand aus gepoolten negativen nasopharyngealen (NP) Abstrichen in viralen Transportmedien (VTM), die von SARS-CoV-2-negativen Personen gesammelt wurden (**Notfallzulassung bezüglich COVID-19 der FDA für molekulare Diagnostika – Vorlage für kommerzielle Hersteller**). Das positive Referenzmaterial bestand aus dem SARS-CoV-2-Stamm USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATtrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, Kat.-Nr. NATSARS(COV2)-ST), der in die Negativmatrix bei zweifachem Wert der Nachweisgrenze (LOD) eingesetzt wurde.

Für jedes getestete MGIEasy Nukleinsäure-Extraktionskit wurde die prozentuale Trefferquote der korrekt identifizierten Proben berechnet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 14** zusammengefasst. Der mittlere Cq-Wert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient (%) für jedes Target (ORF1ab, RdRp und IC) für jedes Extraktionskit sind in **Tabelle 15** aufgeführt. Die IC (IK) war für alle Proben gültig. Die Trefferquote für jedes MGIEasy Nukleinsäure-Extraktionskit lag bei  $\geq 95$  %, was die LOD des *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 Assays bestätigt, wenn er mit Proben verwendet wird, die mit dem MGISP-960 Gerät (MGI) extrahiert wurden.

Tabelle 14. Trefferquote (%) bei mit MGISP-960 extrahierte Proben

Proben	Gesamtzahl der Wiederholungen	Extraktionskit 1		Extraktionskit 2	
		Anzahl der korrekt identifizierten Wiederholungen	Trefferquote (%)	Anzahl der korrekt identifizierten Wiederholungen	Trefferquote (%)
SARS-CoV-2 positive Proben (2X LOD)	30	30	100	30	100
SARS-CoV-2-negative Proben	60	60	100	60	100

Tabelle 15. Übersichtstabelle für mittlere Cq-Werte, Standardabweichungen und VK% für alle Targets.

	Extraktion Charge 1								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Probentyp	Mittlerer Cq	SD	VK%	Mittlerer Cq	SD	VK%	Mittlerer Cq	SD	VK%
SARS positiv	21,06	0,34	1,61	22,19	0,39	1,76	21,38	0,32	1,51
SARS negativ	--	--	--	--	--	--	21,62	0,44	2,05
	Extraktion Charge 2								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Probentyp	Mittlerer Cq	SD	VK%	Mittlerer Cq	SD	VK%	Mittlerer Cq	SD	VK%
SARS positiv	22,20	0,38	1,70	23,27	0,41	1,76	21,44	0,34	1,60
SARS negativ	--	--	--	--	--	--	21,87	0,23	1,03

### 16.2.3 Analytische Spezifität

Ein Panel von 20 Mikroorganismen, darunter Organismen, die üblicherweise in den menschlichen Atemwegen vorkommen, sowie solche, die eng mit SARS-CoV-2 verwandt sind, wurden auf Hinweise auf Kreuzreaktivität im **PlexPCR<sup>®</sup>**SARS-CoV-2-Assay untersucht. Diese Studie wurde mit dem LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II durchgeführt. Eine Liste der getesteten Organismen finden Sie in **Tabelle 16**. Die Organismen wurden mit  $1 \times 10^5$  cfu/mL oder  $1 \times 10^5$  pfu/mL oder  $10^5$  TCID<sub>50</sub> pro mL getestet, sofern nicht anders angegeben, wobei alle Verdünnungen in negativen Nasopharyngalabstrichen in VTM hergestellt wurden. Die Tests wurden in Abwesenheit des positiven Referenzmaterials (SARS-CoV-2) in dreifacher Ausführung durchgeführt. In keinem dieser Experimente wurden in Abwesenheit des Targets positive Signale im **PlexPCR<sup>®</sup>** SARS-CoV-2 -Assay generiert und es wurde kein Einfluss auf die Leistung des Assays in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines der getesteten Mikroorganismen beobachtet.

Tabelle 16. Auf Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen	
Organismen	Getestete Konzentration
Humanes Coronavirus 229E	5,00E+06 Genome/mL
Humanes Coronavirus OC43	5,00E+06 Genome/mL
Adenovirus 1	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Parainfluenza Virus 3	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Influenza A Virus	1,00E+05 PFU/mL
Influenza B Virus	1,00E+05 PFU/mL
Enterovirus A71	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Respiratorisches Synzytial-Virus A	1,00E+05 PFU/mL
Rhinovirus 17	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,00E+06 Genome/mL
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Bordetella pertussis</i>	1,45E+05 Genome/mL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
Gepoolte menschliche Nasenspülung	unverdünnt
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus salivarius</i>	2,51E+08 Genome/mL

#### 16.2.4 *In-silico*-Analyse

Es wurde eine *In-silico*-Analyse durchgeführt, um das Potenzial für eine Kreuzreaktivität der im **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 -Assay enthaltenen Primer und Sonden mit weiteren humanen und nicht-humanen Coronaviren zu bewerten. Der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 -Assay wies keine vorhergesagte Kreuzreaktivität mit Nicht-Coronavirus- oder anderen humanen Coronavirus-Sequenzen auf, basierend auf einem Homologie-Schwellenwert von >80 %.

##### **Spezifität gegenüber Nicht-Coronavirus-Sequenzen**

Die ORF1ab- und RdRp-Assay-Oligosequenzen wurden verwendet, um nach Nicht-Coronavirus-Sequenzen zu suchen, die eng mit der Zielregion übereinstimmen, um das Potenzial für Kreuzreaktivität zu bewerten. Bei keinem der Assay-Oligos wurde eine signifikante Kreuzreaktivität mit Nicht-Coronavirus-Organismen beobachtet.

##### **Spezifität gegenüber anderen Coronaviren**

Der BLAST-Lauf mit dem RdRp-Assay-Amplikon ergab 3.027 Coronavirus-Sequenzen. Bei der Analyse mit CLC Main Workbench 20.0.4 konnte festgestellt werden, dass die einzigen Sequenzen, an die die Assay-Oligos binden können, synthetische SARS-CoV-2-Konstrukte und zwei Fledermaus-Coronavirus-Sequenzen (MN996532.1 und KP876546.1) sind. Es wurde also keine Kreuzreaktivität mit anderen humanen Coronavirus-Sequenzen beobachtet.

Der BLAST-Lauf mit dem ORF1ab-Assay-Amplikon ergab 272 Coronavirus-Sequenzen. Bei der Analyse mit CLC Main Workbench 20.0.4 konnte festgestellt werden, dass die einzigen Sequenzen, an die die Assay-Oligos binden können, synthetische SARS-CoV-2-Konstrukte sind. Es wurde also keine Kreuzreaktivität mit anderen humanen Coronavirus-Sequenzen beobachtet.

#### 16.2.5 *Inklusivität*

Die Abfrage der GISAID EpiCoV-Datenbank erfolgte am 1. Juni 2020. Der resultierende Datensatz enthielt 24462 SARS-CoV-2-Genomsequenzen für den ORF1ab-Assay und den RdRp-Assay.

Um die Inklusivität des **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assays zu demonstrieren, wurde das GISAID EpiCoV eigenständig mit jedem der im Assay enthaltenen Oligonukleotid-Primer und Sonden abgefragt. Weniger als 0,2 % der SARS-CoV-2-Sequenzen in der Datenbank (n >24.000, Stand: 1. Juni 2020) wiesen mehr als eine Fehlpaarung mit einem der Primer und Sonden auf, die im **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Assay enthalten sind. Die Überwachung wird fortgesetzt, um sicherzustellen, dass die aktuellen Stämme und gemeldeten Varianten weiterhin einbezogen werden. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

#### 16.2.6 *Potenzielle Störstoffe*

Potenziell störende endogene und exogene Substanzen, die in respiratorischen Proben vorhanden sein könnten, wurden auf ihre Auswirkungen auf die Leistung des **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 -Assays untersucht. Diese Studie wurde mit dem LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II durchgeführt. Alle Substanzen wurden dreimal mit negativen Nasopharyngealabstrichen in VTM in Anwesenheit und in Abwesenheit des Targets getestet. Es gab keine Hinweise auf eine negative Auswirkung auf die Assay-Leistung, als künstliche Proben getestet wurden, die die potenziellen Störstoffe in den angegebenen Konzentrationen enthielten. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 17** zusammengefasst.

Tabelle 17. Potenzielle Störstoffe in Atemwegsproben	
Potenzielle Störstoffe	Testkonzentration
Phenylephrin	15 Gew./Vol.-%
Beclomethasondipropionat	5 Vol.-%
Zanamivir	3,3 mg/mL
Ribavirin	2 Gew./Vol.-%
Mupirocin	6,6 mg/mL
Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin	4,4 µg/mL
Menthol	6,9 mg/mL

## 17 Kundenservice und technischer Support

Bitte wenden Sie sich mit Fragen zu Reaktionsaufbau, Zyklusbedingungen und anderen Anliegen an den technischen Support.

Tel.: +61 2 9209 4169, E-Mail: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 18 Literaturhinweise

1. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 1, 21 January 2020. Weltgesundheitsorganisation. Zu finden unter: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>.
2. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Weltgesundheitsorganisation. Zu finden unter: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
3. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. Zu finden unter: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.

**19 Anhang 1: LightCycler® 480 Instrument II**

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die LightCycler 480 Software (Version 1.5).

Das **PlexPCR®** SARS-CoV-2-Kit enthält Farbstoffe für das LightCycler® 480 Instrument II. Das **PlexPCR®** Farbkompensations-Kit (Katalog-Nr. 90001) muss für LC480 II-Analysen durchgeführt und angewendet werden (siehe **Abschnitt 19.3**). Dieses Kit ist auf Anfrage lieferbar.

**19.1 Programmierung des LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)**

**Detection Format (Detektionsformat)**

Erstellen Sie ein benutzerdefiniertes **Detection Format (Detektionsformat)**.

**Open Tools (Tools öffnen) > Detection Formats (Detektionsformate)**

Erstellen Sie ein neues Detektionsformat und nennen Sie es „**SpeedX Plex PCR**“ (kann auch während der Generierung der SpeedX-Farbkompensationsdatei erstellt werden) (siehe **Abbildung 2**).

Wählen Sie für **Filter Combination Selection (Filterkombinationsauswahl)** Folgendes aus (Excitation-Emission (Anregungsemission)):

Tabelle 18. Filterkombinationen *						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

\*Diese Filterkombinationen sind die Standardbezeichnungen für die Kanäle

Stellen Sie die **Selected Filter Combination List (Liste ausgewählter Filterkombinationen)** für alle Kanäle wie folgt ein:

Melt Factor (Schmelzfaktor): 1

Quant Factor (Quantifizierungsfaktor): 10

Max Integration Time (sec) (Maximale Integrationszeit (s)): 1

**Abbildung 2. Benutzerdefiniertes SpeedX Detektionsformat**

Selected Filter Combination List						
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)	
440	488	440-488	1	10	1	
465	510	465-510	1	10	1	
533	580	533-580	1	10	1	
533	610	533-610	1	10	1	
533	640	533-640	1	10	1	
618	660	618-660	1	10	1	

### **Instrumenteneinstellungen**

Erstellen Sie ein benutzerdefiniertes **Detection Format (Detektionsformat)**.

**Open Tools (Tools öffnen) > Instruments (Instrumente).**

Wählen Sie in **Instrument Settings (Instrumenteneinstellungen) > die Option Barcode Enabled (Strichcode aktiviert)**

### **Experiment setup (Versuchsaufbau)**

Wählen Sie **New Experiment (Neuer Versuch)**

Auf der Registerkarte **Run Protocol (Durchlaufprotokoll)**

Wählen Sie als **Detection Format (Detektionsformat)** den benutzerdefinierten Eintrag „**SpeedX PlexPCR**“ (**Abbildung 3**)

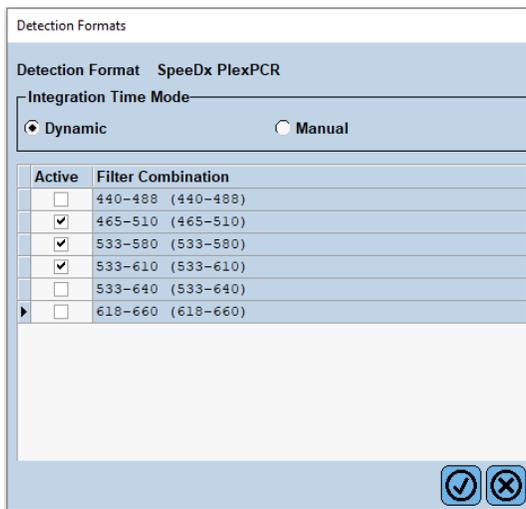
Wählen Sie **Customize (Anpassen) >**

Wählen Sie **Integration Time Mode (Integrationszeitmodus) > Dynamic (Dynamisch)**

Wählen Sie die folgenden aktiven **Filter Combinations (Filterkombinationen)** in **Tabelle 19**

Tabelle 19. Kanäle für die <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Targets			
Kanal	465-510	533-580	533-610
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (interner Kontrolle)

**Abbildung 3. Detection Format (Detektionsformat) anpassen**



Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu ermöglichen, weisen Sie den Wells auf der Platte Bezeichnungen zu (siehe **Abschnitt 21.4**)

Öffnen Sie das Modul **Sample Editor (Probeneditor)**.

Wählen Sie eine Well

Bearbeiten Sie den **Sample Name (Probennamen)**, sodass er mit der im Assaymodul der Analysesoftware definierten Bezeichnung identisch ist (siehe **Abschnitt 21.4**)

Die Proben sind mit *Präfix\_Suffix* gekennzeichnet (siehe **Tabelle 20** und **Abbildung 4**) z. B. NEG\_CoV.

**HINWEIS:** Die Probenbezeichnungen unterscheiden zwischen Klein- und Großbuchstaben. Die Bezeichnung muss mit den in der Ausführungsdatei zugewiesenen Bezeichnungen identisch sein.

Tabelle 20. Probenbezeichnungen für Analysesoftware			
Probentyp	Präfix_ (in Analysesoftware)	Suffix_ (in Analysesoftware)	Probenname (in Analysesoftware)
Normale Probe	Sample (Probe)	_CoV	Sample_CoV
Negativkontrolle	N	_CoV	N_CoV
Positivkontrolle	Pa	_CoV	Pa_CoV

Abbildung 4. Sample Editor (Probeneditor) – Zuweisen von Bezeichnungen zu Wells

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name
A12	465-510 (465-510)			S_MG
A12	533-580 (533-580)			S_MG
A12	533-640 (533-640)			S_MG
B12	465-510 (465-510)			Pa_MG
B12	533-580 (533-580)			Pa_MG
B12	533-640 (533-640)			Pa_MG
C12	465-510 (465-510)			Pb_MG
C12	533-580 (533-580)			Pb_MG
C12	533-640 (533-640)			Pb_MG
G8	465-510 (465-510)			N_MG
G8	533-580 (533-580)			N_MG
G8	533-640 (533-640)			N_MG

Stellen Sie das **Reaction Volume (Reaktionsvolumen)** auf > 10 µL ein Erstellen Sie das folgende Programm (im Detail in **Abbildung 5 - Abbildung 9** dargestellt)

Tabelle 21. Thermocycling-Programm					
Programmname	Cycles (Zyklen)	Target (Zieltemperatur) °C	Hold (Dauer)	Ramp Rate (Rampenrate) (°C/s)*	Ramp Rate (Rampenrate) (°C/s)§
Reverse Transkription	1	48 °C	10 Min.	4,4	4,8
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95 °C	2 min	4,4	4,8
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen) <sup>¶</sup> : Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5 °C/Zyklus	10	95 °C	5 s	4,4	4,8
		61 °C - 56,5 °C <sup>¶</sup>	30 s	2,2	2,5
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (Aufnahme/Erkennung)	40	95 °C	5 s	4,4	4,8
		52 °C <sup>+</sup>	50 s	2,2	2,5
Cooling (Abkühlung)	1	40 °C	30 s	2,2	2,5

\* Standard-Rampenrate (96-Well-Platte)

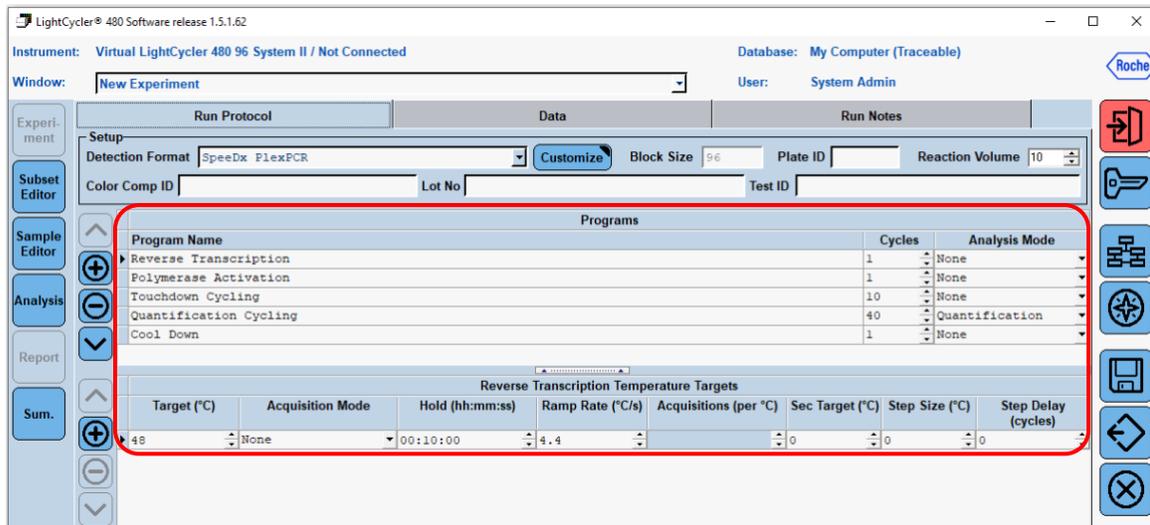
§ Standard-Rampenrate (384-Well-Platte)

¶ Step size (Schrittgröße): -0,5C/Zyklus, Sec Target (Sek. Ziel): 56 °C

+ Analysis mode (Analysemodus): Quantification (Quantifizierung), Acquisition mode (Aufnahmemodus): Single (Einzeln)

#### > Start Run (Durchlauf starten)

Abbildung 5. Thermocycling-Programm – Reverse Transkription



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable) User: System Admin

Window: New Experiment

Setup: Detection Format SpeedX FlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Reverse Transcription Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
48	None	00:10:00	4.4	0	0	0	0

Abbildung 6. Thermocycling-Programm – Polymeraseaktivierung

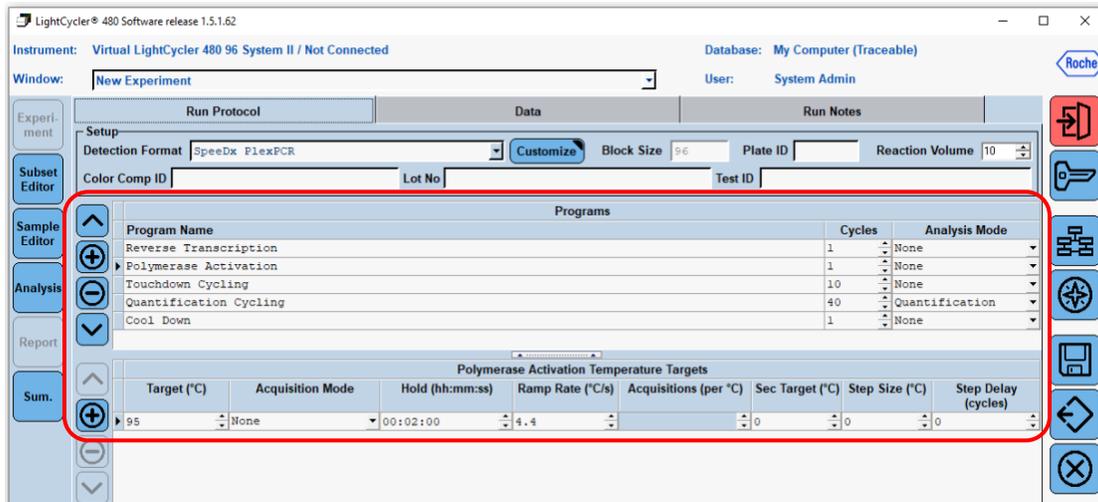


Abbildung 7. Thermocycling-Programm – Touchdown-Zyklus

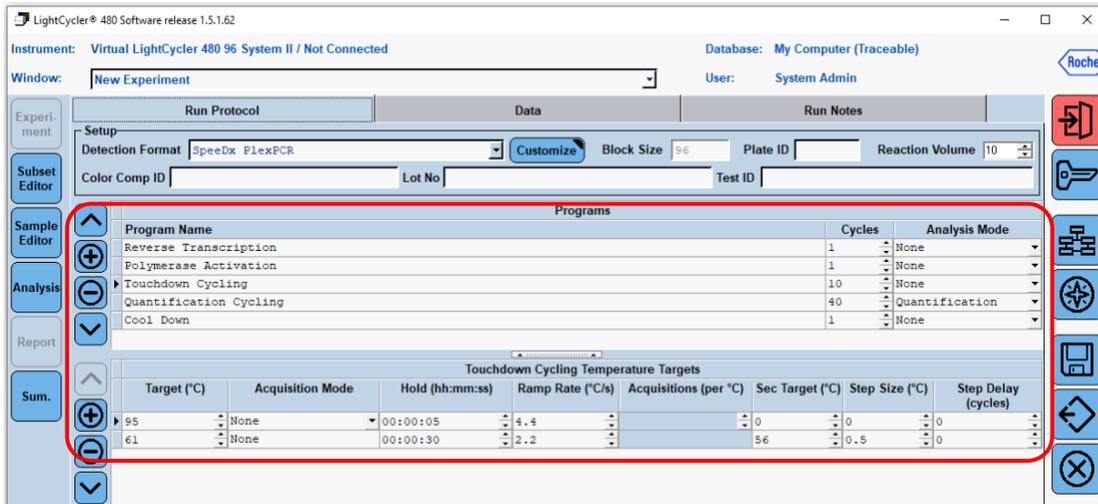


Abbildung 8. Thermocycling-Programm – Quantifizierungszyklus

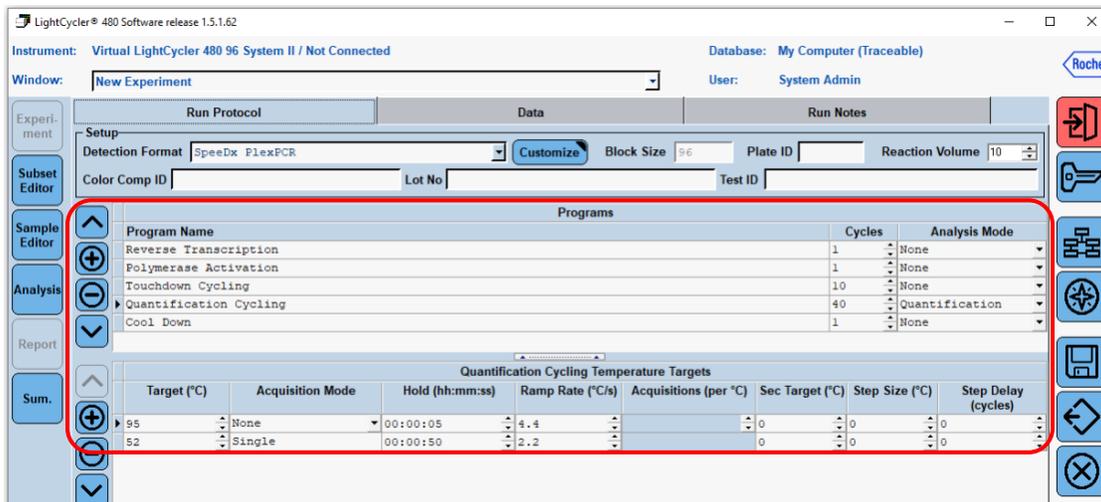
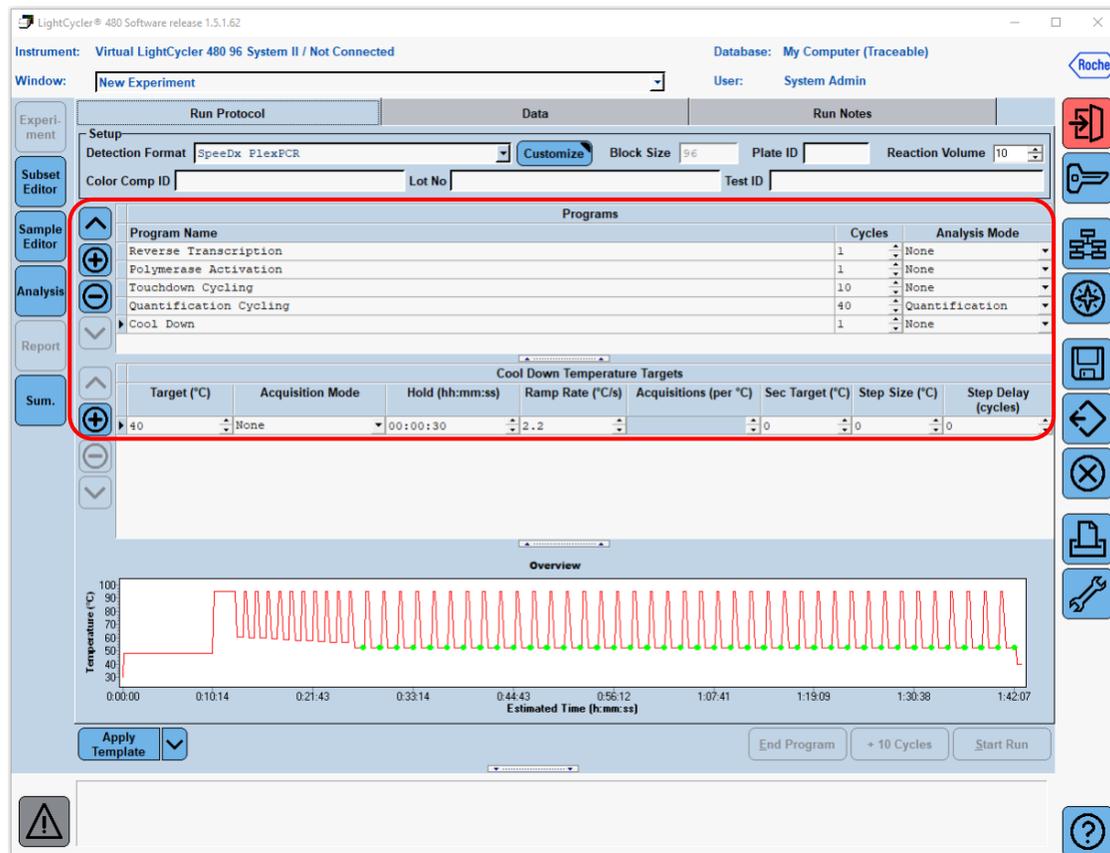


Abbildung 9. Thermocycling-Programm – Abkühlung



Exportieren Sie nach Abschluss des Zyklusprogramms eine .ixo- Datei zur Analyse in die **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480) - Analysesoftware.

Wählen Sie **Export**

Speichern Sie an einem leicht auffindbaren Ort.

## 19.2 Einrichten einer Makro-Vorlage für das LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

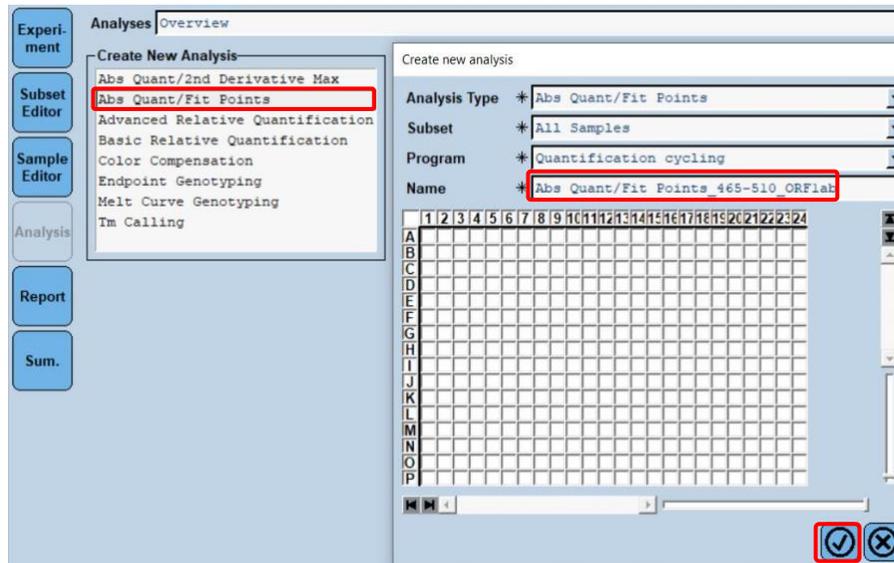
Die Datenauswertung kann mit der LC480 II Onboard-Software unter Verwendung einer Makro-Vorlage mit den unten aufgeführten validierten Parametern durchgeführt werden. Wenn Sie weitere Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

### Einstellungen der Makro-Vorlage

Wählen Sie eine Ausführungsdatei mit den **SpeedX PlexPCR Cycling**-Parametern

Wählen Sie **Analysis** (Analyse) > **Abs Quant/Fit Points** > ändern Sie den Namen in **Abs Quant/Fit Points\_465-510\_ORF1ab** > **Ok**

Abbildung 10. Abs Quant/Fit Points - 465-510 ORF1ab

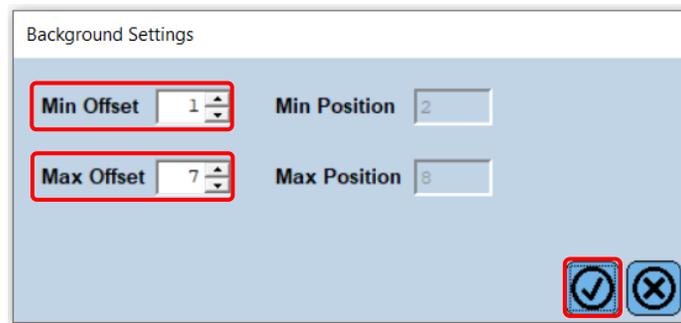


Filterkombi 465 – 510 auswählen

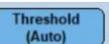
Wenden Sie die **Farbkompensation** für alle Kanäle an > **Ok**

Wählen Sie die Registerkarte **Cycle Range** (Zyklusbereich) > **Background settings** (Hintergrundeinstellungen) > Bearbeiten Sie den **Min.-** und **Max.-Offset** > **Ok**

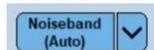
Abbildung 11 Hintergrundeinstellungen - 465-510 ORF1ab



Wählen Sie die Registerkarte **Analysis** (Analyse) und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist

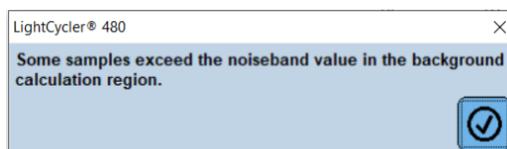


Wählen Sie die Registerkarte **Noiseband** und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist



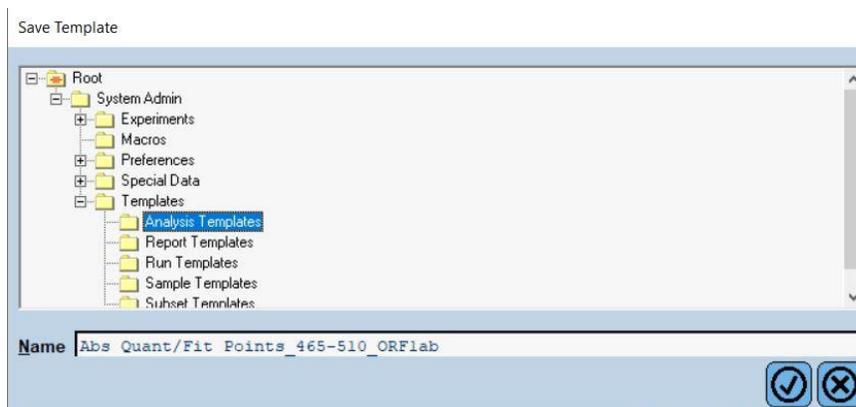
Klicken Sie auf **Calculate** (Ermitteln) (wenn eine Probenkurve den Hintergrundbereich überschritten hat, erscheint die folgende Meldung (**Abbildung 12**); der Benutzer muss die Probe verdünnen und erneut testen) > **Ok**, um die Analyse fortzusetzen

Abbildung 12. Noiseband-Warnmeldung



Wählen Sie **Save As Template** (Als Vorlage speichern) im Ordner **Templates** (Vorlagen) > **Analysis Templates** (Analysevorlagen) und fügen Sie den Kanal und das Target in das Benennungsformat ein > **Ok**

**Abbildung 13 Speichern der Analysevorlage Abs Quant/Fit Points - 465-510 ORFlab**

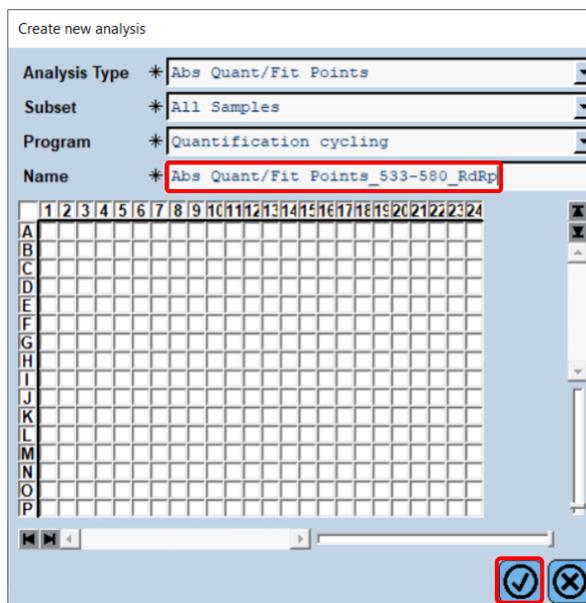


Klicken Sie auf das  Symbol, um die für den Kanal eingestellten Analyseparameter zu speichern

Klicken Sie auf das  Symbol, um eine **new analysis** (neue Analyse) zu erstellen

Wählen Sie **Abs Quant/Fit Points** > ändern Sie den Namen zu **Abs Quant/Fit Points\_533-580\_RdRp** > **Ok**

**Abbildung 14. Abs Quant/Fit Points 533-580 RdRp**

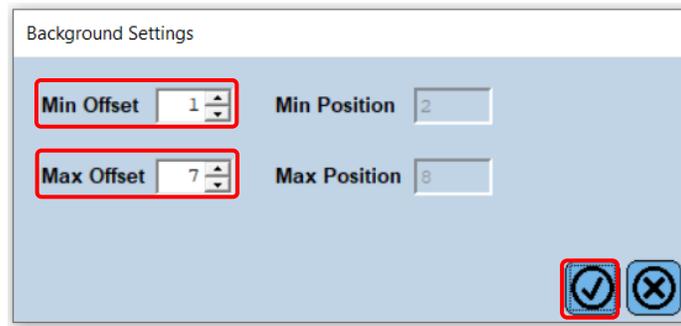


**Filterkomb 533 – 580** auswählen

Wenden Sie die **Colour Compensation** (Farbkompensation) für alle Kanäle an > **Ok**

Wählen Sie die Registerkarte **Cycle Range** (Zyklusbereich) > **Background settings** (Hintergrundeinstellungen) > Bearbeiten Sie den **Min.-** und **Max.-Offset** > **Ok**

Abbildung 15 Hintergrundeinstellungen - 533-6580 RdRp



Wählen Sie die Registerkarte **Analysis** (Analyse) und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist

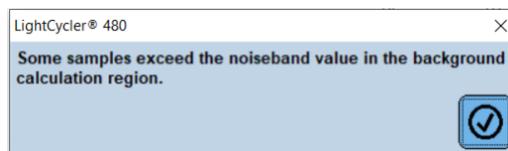
Threshold  
(Auto)

Wählen Sie die Registerkarte **Noiseband** und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist

Noiseband  
(Auto)

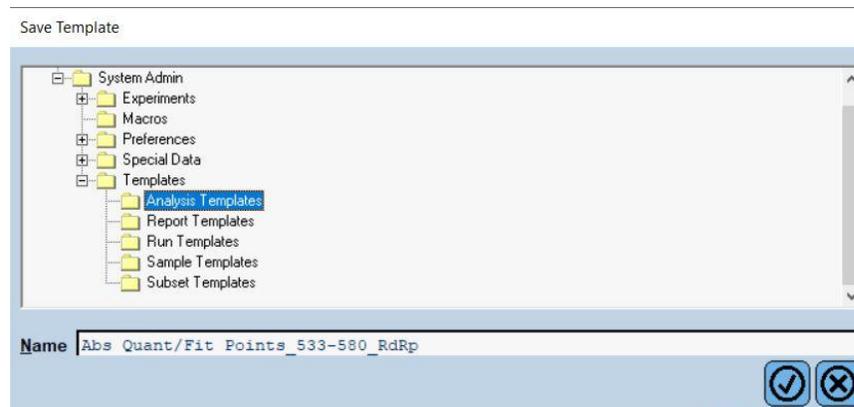
Klicken Sie auf **Calculate** (Ermitteln) (wenn eine Probenkurve den Hintergrundbereich überschritten hat, erscheint die folgende Meldung (**Abbildung 16**); der Benutzer muss die Probe verdünnen und erneut testen) > **Ok**, um die Analyse fortzusetzen

Abbildung 16. Noiseband-Warnmeldung



Wählen Sie **Save As Template** (Als Vorlage speichern) im Ordner **Templates** (Vorlagen) > **Analysis Templates** (Analysevorlagen) und fügen Sie den Kanal und das Target in das Benennungsformat ein > **Ok**

Abbildung 17. Speichern der Analysevorlage Abs Quant/Fit Points – 533-580 RdRp

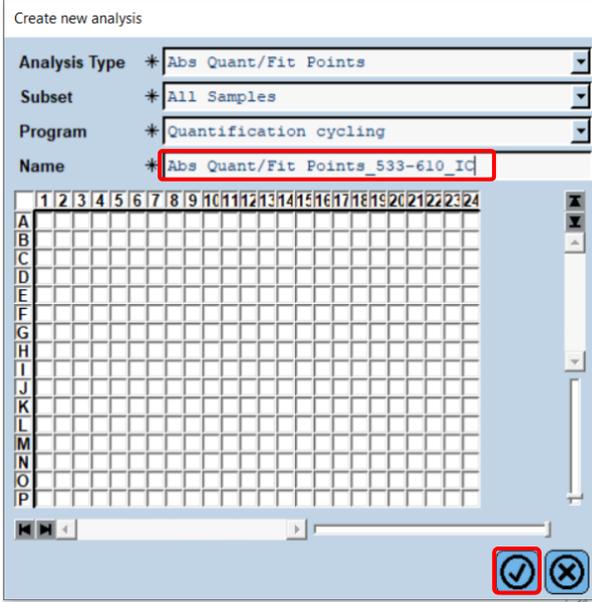


Klicken Sie auf das  Symbol, um die für den Kanal eingestellten Analyseparameter zu speichern

Klicken Sie auf das  Symbol, um eine **new analysis** (neue Analyse) zu erstellen

Wählen Sie **Abs Quant/Fit Points** > ändern Sie den Namen zu **Abs Quant/Fit Points\_533-610\_IC** > **Ok**

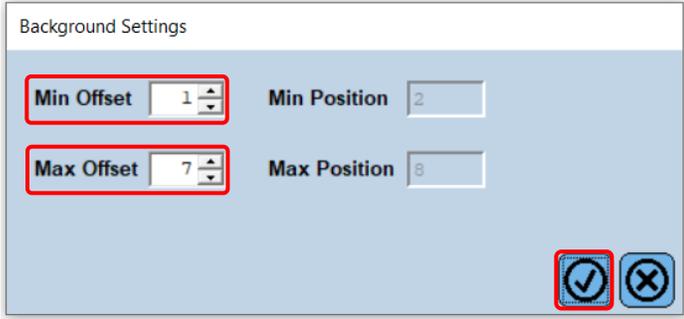
Abbildung 18. Abs Quant/Fit Points 533-610 Interne Kontrolle



**Filter Comb 533 – 610** (Filterkomb 533 – 610) auswählen

Wählen Sie die Registerkarte **Cycle Range** (Zyklusbereich) > **Background settings** (Hintergrundeinstellungen) > Bearbeiten Sie den **Min.-** und **Max.-Offset** > **Ok**

Abbildung 19. Hintergrundeinstellungen – 533-610 Interne Kontrolle



Wählen Sie die Registerkarte **Analysis** (Analyse) und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist

Threshold  
(Auto)

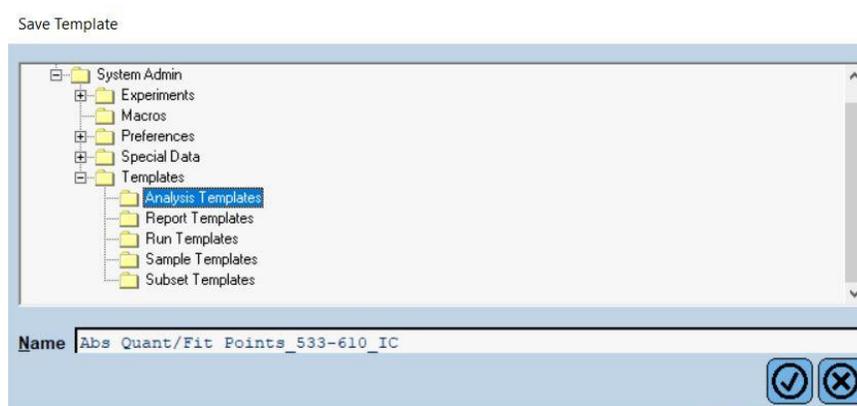
Wählen Sie die Registerkarte **Noiseband** und stellen Sie sicher, dass die folgende Einstellung ausgewählt ist

Noiseband  
(Auto)

Klicken Sie auf **Calculate** (Ermitteln)

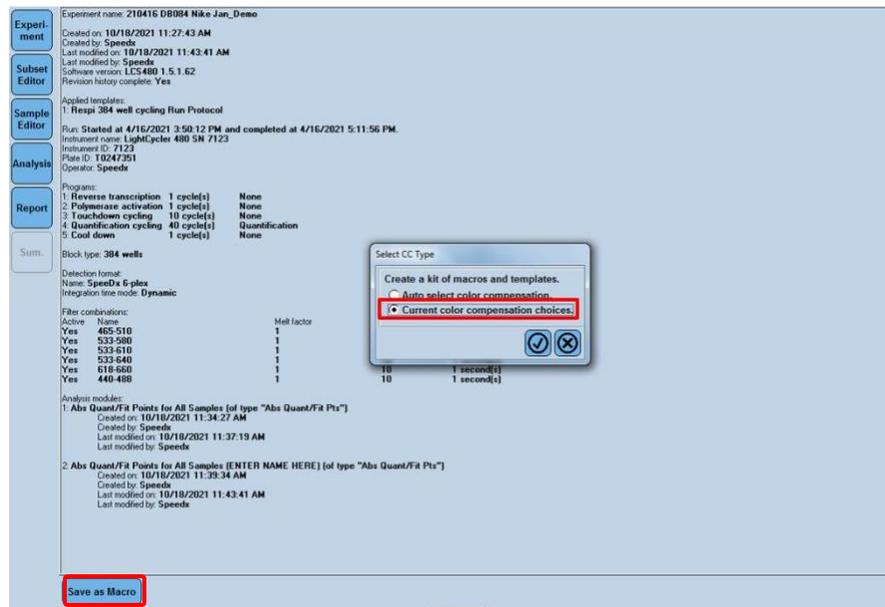
Wählen Sie **Save As Template** (Als Vorlage speichern) im Ordner **Templates** (Vorlagen) > **Analysis Templates** (Analysevorlagen) und fügen Sie den Kanal und das Target in das Benennungsformat ein > **Ok**

Abbildung 20. Speichern der Analysevorlage Abs Quant/Fit Points – 533-610 Interne Kontrolle



Wählen Sie die Registerkarte **Summary tab** (Zusammenfassung) > **Save As Macro** (Als Makro speichern) > **Current colour compensation choices** (Aktuelle Farbkompensationsoptionen)

Abbildung 21. Auswahl des CC-Typs

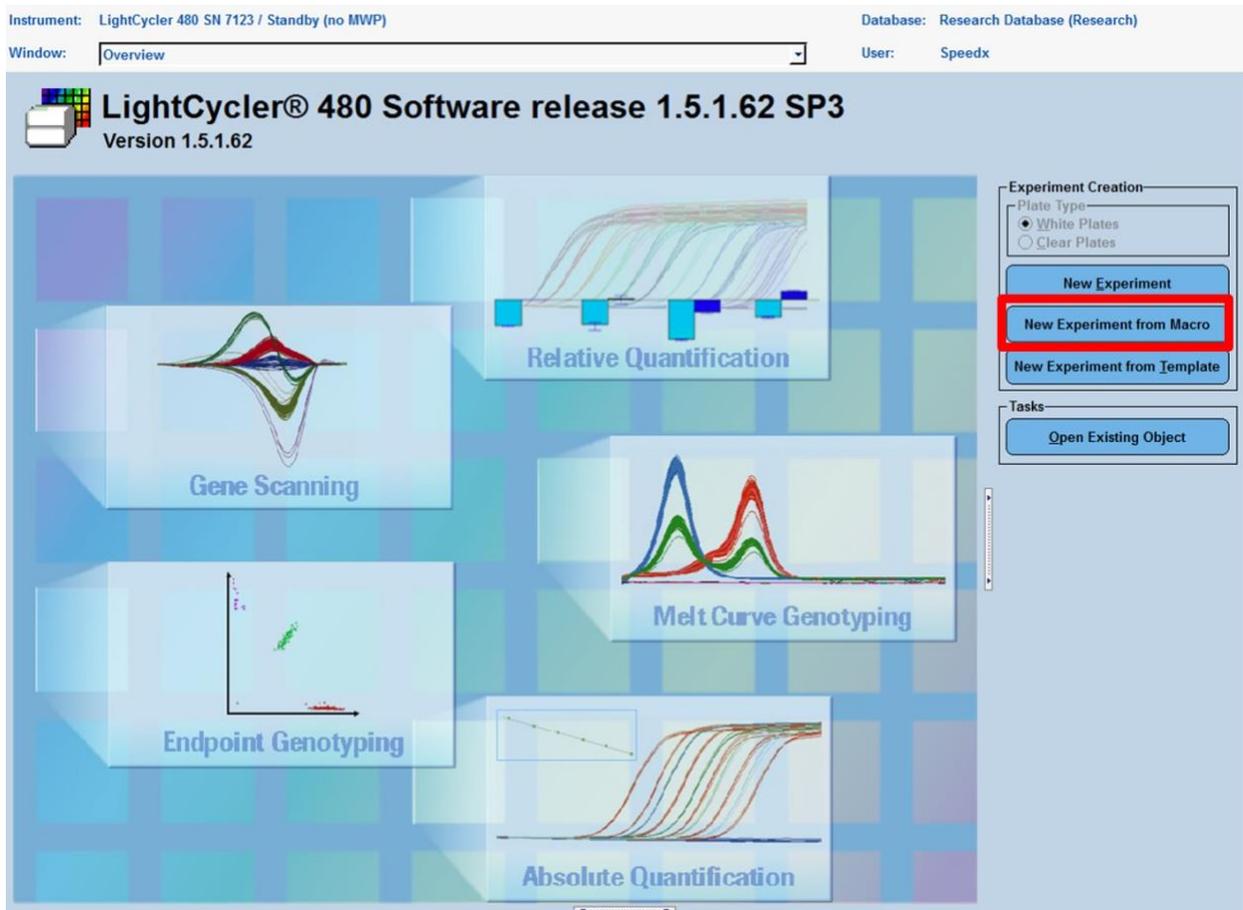


Diese **Macro template** (Makro-Vorlage) kann nun beim Einrichten eines Durchlaufs ausgewählt werden.

#### **Makro-Vorlage einrichten**

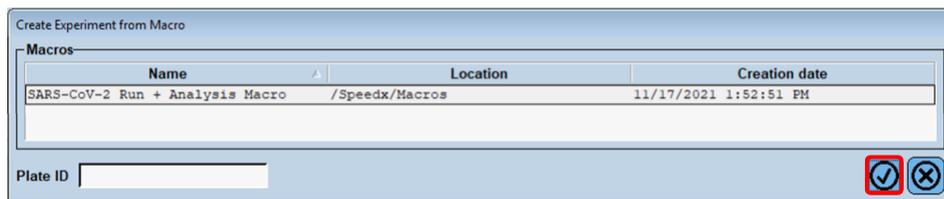
Wählen Sie **New Experiment from Macro** (Neues Experiment aus Makro)

Abbildung 22. Neues Experiment aus Makro auswählen



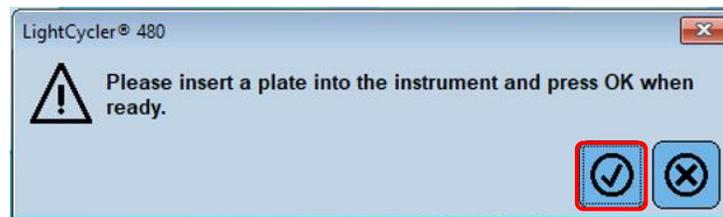
Wählen Sie die Datei aus dem Ordner **Macros** (Makros) > **Ok**

Abbildung 23. Makro-Vorlage auswählen



Setzen Sie die vorbereitete PCR-Platte ein, wenn die folgende Aufforderung erscheint > **Ok** und der Durchlauf beginnt automatisch

Abbildung 24. Plattenmeldung einfügen



Fahren Sie mit der Verwendung des **Subset Editor** (Subset-Editors) und des **Sample Editor** (Probeneditors) fort, um eine angemessene Beschriftung der ausgegebenen Ergebnisse sicherzustellen.

### 19.3 Colour Compensation (Farbkompensation) für LightCycler® 480 Instrument II

**HINWEIS:** Das **PlexPCR®** Farbkompensations-Kit (Katalog-Nr. 90001) muss für LC480 II-Analysen ausgeführt und übernommen werden. Dieses Kit ist auf Anfrage lieferbar.

Damit Analysen durchgeführt werden können, muss der Sample Name (Probenname) der Farbkompensationsreaktionen entsprechend den Angaben in **Tabelle 22** gekennzeichnet werden.

Exportieren Sie nach Abschluss des Zyklusprogramms eine .ixo- Datei zur Analyse in die **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480) - Analysesoftware.

Wählen Sie **Export**

Speichern Sie an einem leicht auffindbaren Ort.

Tabelle 22. Name der Probe für Farbkompensationsreaktionen für die Analysesoftware							
Reaktionen							
	BLANK (LEERPROBE)	488 mix (488-Gemisch)	510 mix (510-Gemisch)	580 mix (580-Gemisch)	610 mix (610-Gemisch)	640 mix (640-Gemisch)	660 mix (660-Gemisch)
<b>Dominant Channel (Dominierender Kanal)</b>	Wasser	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660
<b>Sample Name (Name der Probe)</b>	BLANK (LEERPROBE)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660

### 19.4 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Daten kann mit der LC480 II On-Board-Software oder der **PlexPCR®** SARS-CoV-2 Analysesoftware (LC480) erfolgen. Die **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480) Analysesoftware kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Zur Interpretation der Ergebnisse ohne die **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480) Analysesoftware muss jede Probe einzeln analysiert werden. Siehe **Tabelle 23** zur Interpretation der Signale von verschiedenen Filterkombinationen.

Jedes Cp, das innerhalb des Cut-off-Wertes registriert wird, gilt bei visueller Bestätigung der Amplifikationskurve als positives Ergebnis (**Tabelle 23**). Beispielhafte Amplifikationskurven sind in **Abbildung 25** dargestellt.

**Hinweis:** Die NTC-Probe sollte in keiner Well ein Signal erzeugen:

→ Das Ergebnis ist UNGÜLTIG und der PCR-Test sollte WIEDERHOLT werden.

#### **Internal Control (interner Kontrolle)**

Die interne Kontrolle überwacht Extraktion und PCR-Hemmung. Die interne Kontrolle ist gültig, wenn der Kanal 533-610 einen Cp-Wert innerhalb des Grenzwertes registriert (**Tabelle 23**). Es ist jedoch möglich, dass ein positives Signal für einen beliebigen Target-Assay (ORF1ab oder RdRp) vorliegt, wenn die interne Kontrolle negativ ist. Bei solchen Proben wird das Vorhandensein des Targets dennoch als gültiges Ergebnis interpretiert.

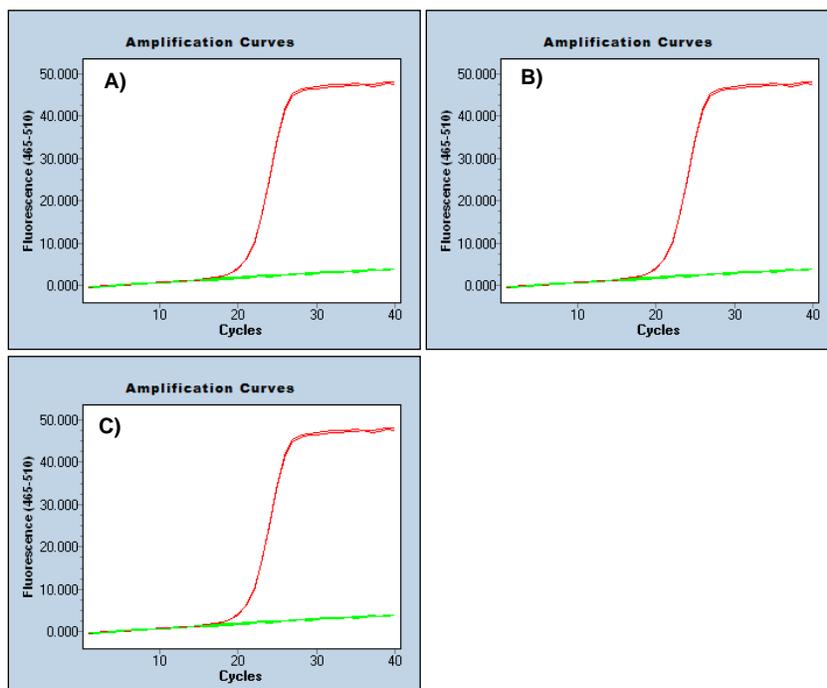
**Hinweis:** Für Proben, bei denen die Target-Assays negativ sind und der interne Kontroll-Assay ebenfalls negativ ist:

→ Das Ergebnis ist UNGÜLTIG und die Extraktion und der PCR-Test sollten WIEDERHOLT werden.

Tabelle 23. Auswertung der Ergebnisse (LC480 II)			
Auswertung	Target		
	ORF1ab (465-510)	RdRp (533-580)	Interne Kontrolle (533-610) <sup>^</sup>
SARS-CoV-2 nachgewiesen	< 31	n. zutr.	n. zutr.
SARS-CoV-2 nachgewiesen	n. zutr.	< 31	n. zutr.
SARS-CoV-2 nicht nachgewiesen. IK gültig.	≥ 31	≥ 31	≤ 26
IK ungültig. Probe erneut extrahieren und testen.	≥ 31	≥ 31	≥ 26

<sup>^</sup>Wenn die interne Kontrolle negativ ist, aber ein Target-Assay positiv ist, ist das Ergebnis trotzdem gültig.

Abbildung 25. Beispiel der Amplifikationskurven für A) ORF1ab, B) RdRp, C) Interne Kontrolle. (Positiv (rot) und Negativ (grün)).



Eine Anleitung zur Verwendung der **PlexPCR<sup>®</sup>** SARS-CoV-2 (LC480) Analysesoftware finden Sie in **Anhang A: Ergebnisinterpretation**.

## 20 Anhang 2: Bio-Rad CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ und Real-Time PCR System

Die folgenden Informationen basieren auf der CFX Manager Dx Software (Version 3.1).

Das **PlexPCR**® SARS-CoV-2-Kit enthält Farbstoffe für das CFX96 Dx System. Für alle Kanäle werden standardmäßige Farbstoffkalibrierungen verwendet. Eine benutzerdefinierte Kalibrierung ist nicht erforderlich.

### 20.1 Programmierung des CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Echtzeit-PCR-Nachweis-Systems (CFX96 Dx, CFX96 Touch)

Wählen Sie **View (Anzeigen)**> Öffnen Sie **Run Setup (Einstellungen ausführen)**

In **Run Setup (Einstellungen ausführen)** > Registerkarte **Protocol (Protokoll)** > Wählen Sie **Create New (Neu erstellen)**

Im **Protocol Editor (Protokolleditor)** (siehe **Abbildung 26**):

Stellen Sie das **Sample Volume (Probenvolumen)** auf > 10 µL ein.

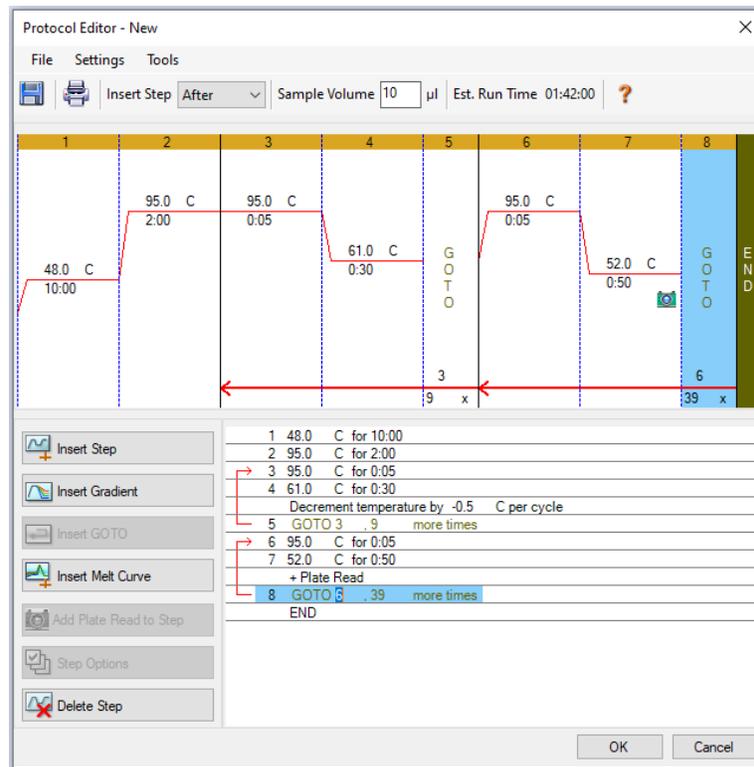
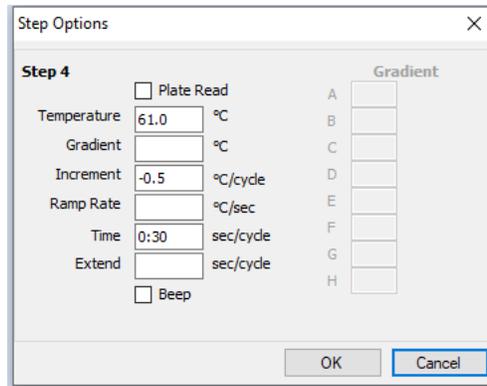
Erstellen Sie das folgende Thermocycling-Programm und speichern Sie es als „**SpeedX PCR**“. Dieses Protokoll kann für künftige Durchläufe ausgewählt werden.

Wählen Sie in Touchdown-Zyklen Schritt 3 und anschließend **Step options (Schrittoptionen)** > Increment (Inkrement): -0,5 °C/Zyklus (siehe **Abbildung 27**).

Tabelle 24. Thermocycling-Programm			
Programmname	Cycles (Zyklen)	Target (Zieltemperatur) °C	Hold (Dauer)
Reverse Transkription	1	48 °C	10 Min.
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen) <sup>◦</sup> :	10	95 °C	5 s
Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5 °C/Zyklus		61 °C - 56,5 °C <sup>◦</sup>	30 s
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) <sup>*</sup> :	40	95 °C	5 s
Acquisition/Detection (Aufnahme/Erkennung)		52 °C <sup>*</sup>	50 s

<sup>◦</sup> **Step options (Schrittoptionen)** > Increment (Inkrement): -0,5 °C/Zyklus

<sup>\*</sup> **Add Plate Read to Step (Plattenablesung zum Schritt hinzufügen)**

**Abbildung 26. Thermocycling Protocol (Thermocycling-Protokoll) – Graphical view (Grafische Ansicht)**

**Abbildung 27. Step Options (Schrittoptionen)**


The 'Step Options' dialog box is shown for Step 4. It contains the following fields and options:

- Step 4**
- Plate Read
- Temperature: 61.0 °C
- Gradient: °C
- Increment: -0.5 °C/cycle
- Ramp Rate: °C/sec
- Time: 0:30 sec/cycle
- Extend: sec/cycle
- Beep
- Gradient** (A-H): A, B, C, D, E, F, G, H

The bottom of the dialog has 'OK' and 'Cancel' buttons.

In **Run Setup (Durchlauf einrichtung)** > Registerkarte **Plate (Platte)**

Wählen Sie **Create New (Neu erstellen)**

Wählen Sie **Settings (Einstellungen)** > **Plate Type (Plattentyp)** > Wählen Sie **BR Clear (BR clear)**

Stellen Sie **Scan mode (Scanmodus)** > All channels (Alle Kanäle) ein.

**Wählen Sie Fluorophores (Fluorophore)** > FAM, HEX, Texas Red (siehe **Tabelle 25**)

Wählen Sie Wells, die Proben enthalten, weisen Sie einen **Sample Type (Proben typ)** zu und prüfen Sie **Load (Laden)** auf Fluorophore (FAM, HEX, Texas Red)

Platte speichern

Tabelle 25. Kanäle für <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 Targets			
Kanal	FAM	HEX	Texas Red
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (interner Kontrolle)

In **Run Setup (Einstellungen ausführen)** > Registerkarte **Start Run (Ausführung starten)**

Wählen Sie einen Block

**Start Run (Durchlauf starten)**

Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu ermöglichen, weisen Sie den Wells auf der Platte Bezeichnungen zu.

Öffnen Sie das Modul **Plate Setup (Platteneinrichtung)**

Wählen Sie eine Well

Bearbeiten Sie den **Sample Name (Probennamen)**, sodass er mit der im **Assaymodul** der Analysesoftware definierten Bezeichnung identisch ist (siehe **Abschnitt 21.4**)

Die Proben sind mit *Präfix\_Suffix* gekennzeichnet (siehe **Tabelle 26** und **Abbildung 28**) z. B. NEG\_CoV.

**HINWEIS:** Die Probenbezeichnungen unterscheiden zwischen Klein- und Großbuchstaben. Die Bezeichnung muss mit den in der Ausführungsdatei zugewiesenen Bezeichnungen identisch sein.

Tabelle 26. Probenbezeichnungen für Analysesoftware			
Probentyp	Präfix_ (in Analysesoftware)	Suffix_ (in Analysesoftware)	Probename (in Analysesoftware)
Normale Probe	Sample (Probe)	_CoV	Sample_CoV
Negativkontrolle	N	_CoV	N_CoV
Positivkontrolle	Pa	_CoV	Pa_CoV

**Abbildung 28. Sample Editor (Probeneditor) – Zuweisen von Bezeichnungen zu Wells**

	1	2	3
A	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
B	S-CoV		
	Unk		
	FAM		
	HEX		
C	Texas Red		
	P_CoV		
	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
	N_CoV		

## 20.2 Auswertung der Ergebnisse anhand der On-Board-Software CFX

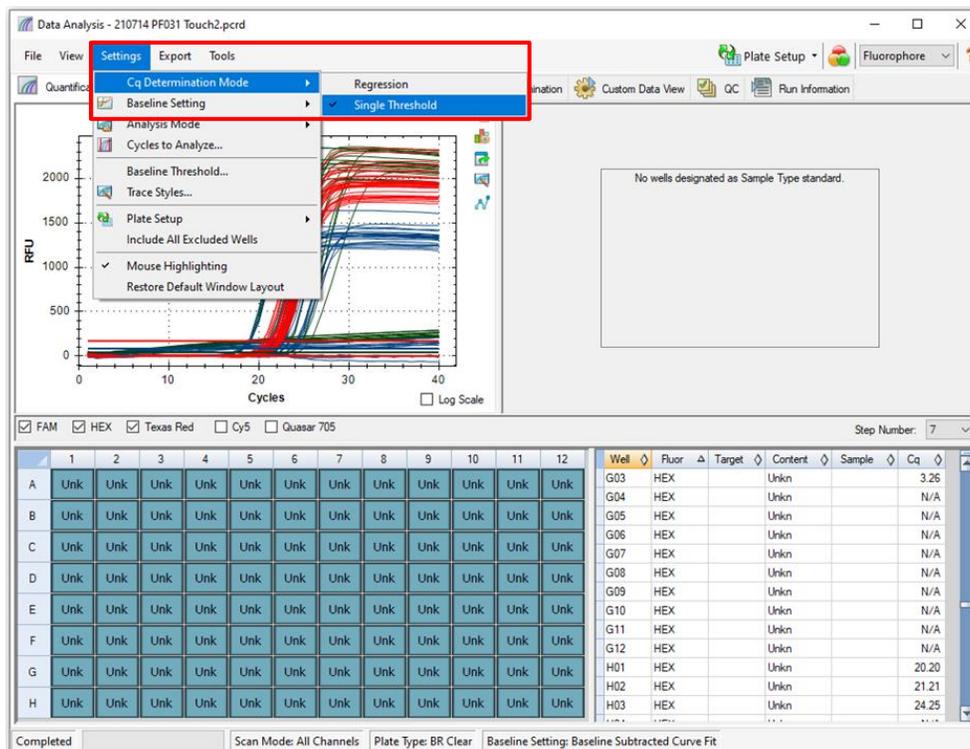
Die Datenauswertung kann mit der On-Board-Software CFX unter Verwendung der unten aufgeführten validierten Parameter durchgeführt werden. Wenn Sie weitere Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Wählen Sie eine Ausführungsdatei mit den **SpeedX PlexPCR Cycling**-Parametern

Vergewissern Sie sich, dass außer den in **Tabelle 25** aufgeführten Kanälen keine weiteren Kanäle ausgewählt sind.

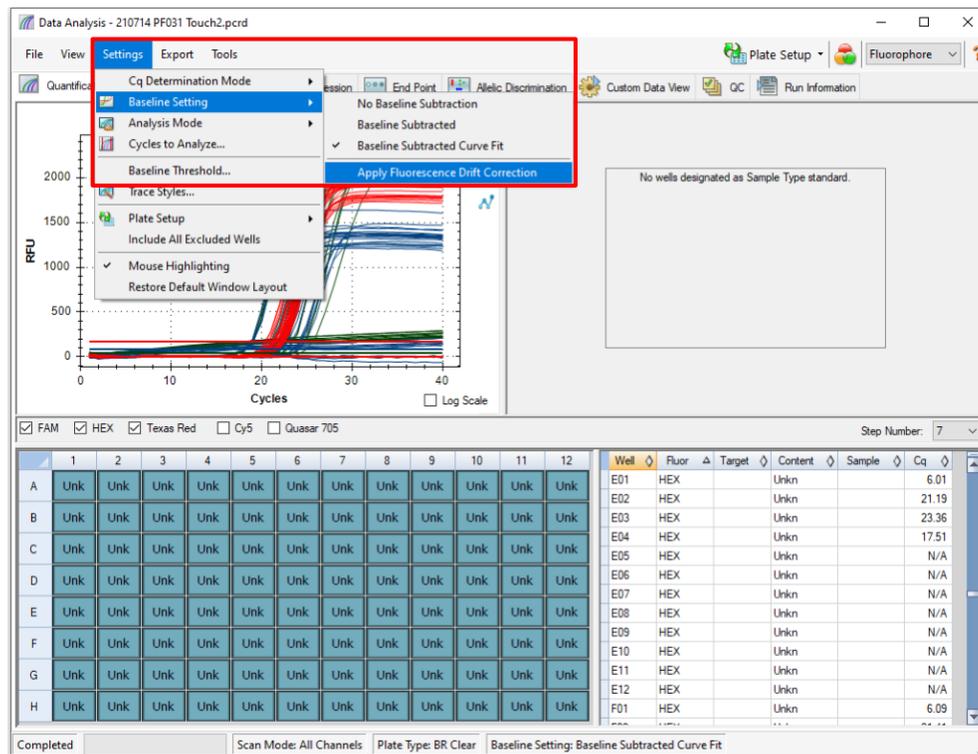
Klicken Sie auf **Settings (Einstellungen) > Cq Determination Mode (Cq-Bestimmungsmodus)** und wählen Sie **Single Threshold (Einzelschwelle)** (**Abbildung 29**).

**Abbildung 29. Einstellungen des Cq-Bestimmungsmodus**



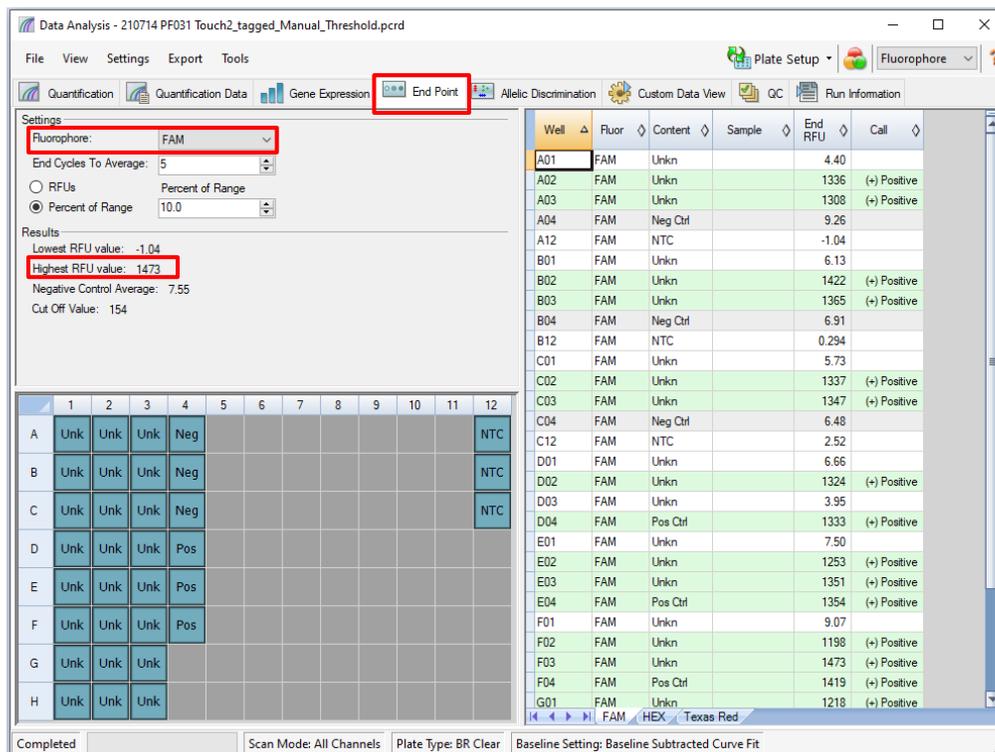
Klicken Sie auf **Settings (Einstellungen) > Baseline Setting (Einstellung der Basislinie)** und wählen Sie **Baseline Subtracted Curve Fit (Kurvenanpassung mit subtrahierter Basislinie)** und aktivieren Sie **Apply Fluorescence Drift Correction (Fluoreszenzdriftkorrektur anwenden)** (**Abbildung 30**)

Abbildung 30. Baseline Settings (Einstellung der Basislinie)



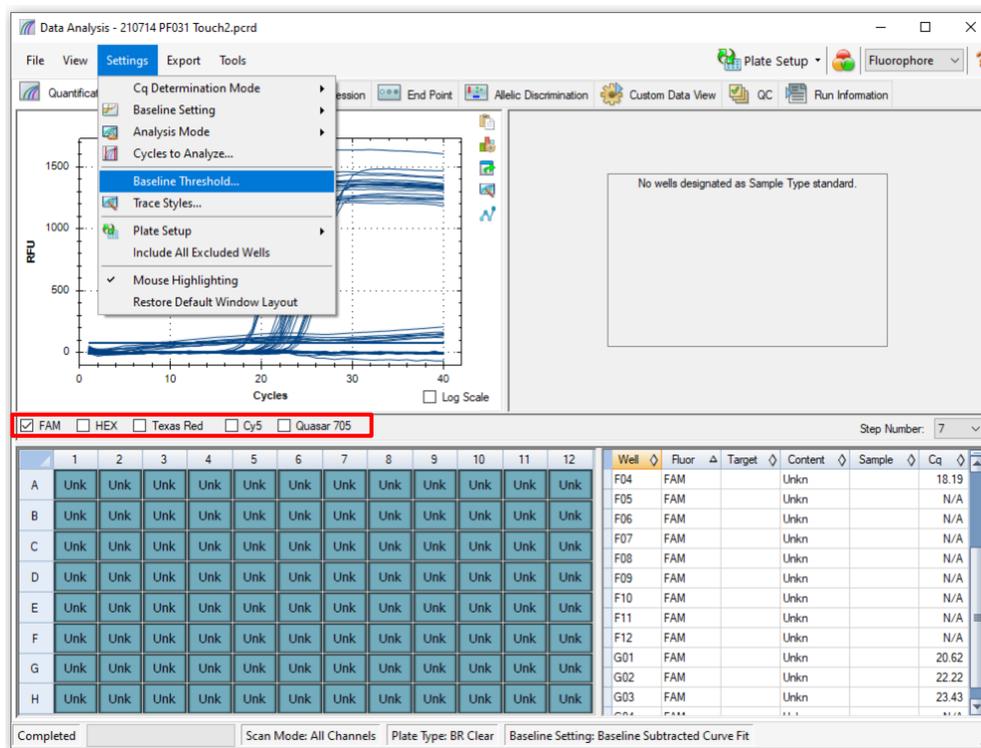
Wählen Sie die Registerkarte **End Point (Endpunkt)**, um die Endpunkt-Fluoreszenzwerte anzuzeigen, wählen Sie **FAM fluorophore (FAM Fluorophor)** aus und notieren Sie den „Höchsten RFU-Wert“ (Abbildung 31).

Abbildung 31. Notieren Sie den „Höchsten RFU-Wert“



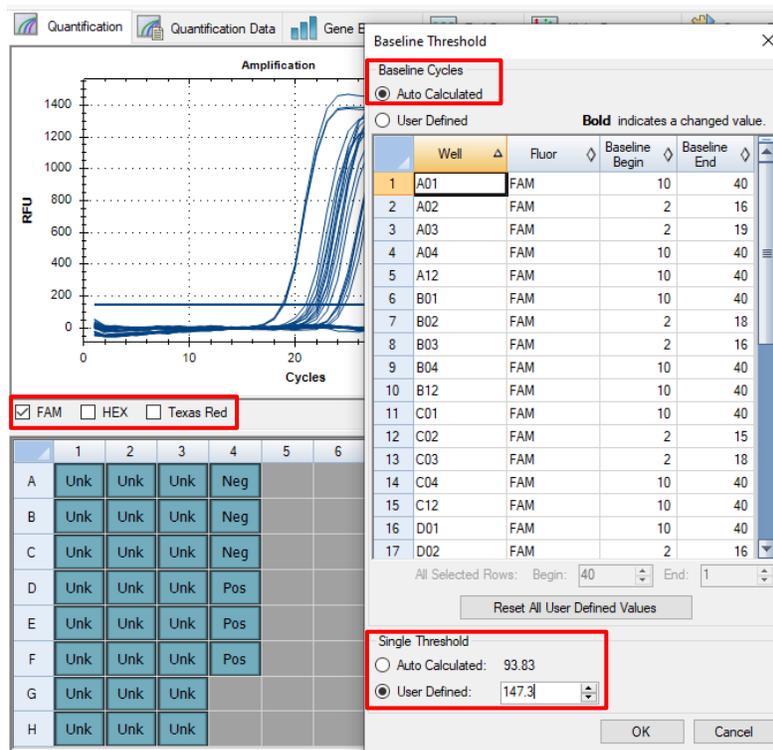
Kehren Sie zur Registerkarte **Quantification (Quantifizierung)** zurück und heben Sie die Auswahl der Fluorophore **HEX** und **Texas Red** auf. Wählen Sie dann **Settings (Einstellungen) > Baseline Threshold (Basislinienschwelle)** (**Abbildung 32**)

**Abbildung 32. Überprüfung der Basislinienschwelle für jeden Kanal**



Aktivieren Sie **Baseline Cycles (Basislinien-Zyklen) > Auto Calculated** for all wells and **Single Threshold** (Automatisch berechnet für alle Wells und Einzelschwelle) > **User Defined (Benutzerdefiniert)** > ändern Sie den Wert auf **10 % des „Höchsten RFU-Wertes“** für diesen Kanal, wie in **Abbildung 31** bestimmt. *Dieser Schritt muss mit jeweils einem ausgewählten Kanal durchgeführt werden* (**Abbildung 33**).

Abbildung33. Einstellungen der Schwellenwerte der Basislinie



Wiederholen Sie die Schritte von **Abbildung 31** bis **Abbildung33** für den **HEX-Kanal** und den **Texas Red-Kanal**. Beachten Sie, dass diese Schritte mit jeweils einem ausgewählten Kanal durchgeführt werden müssen

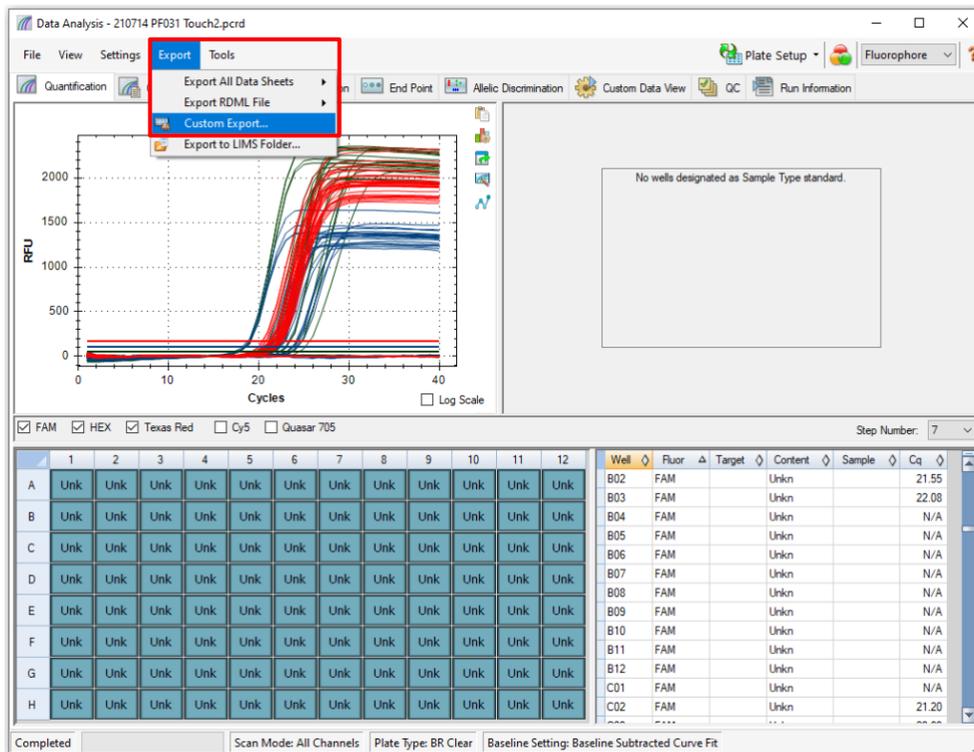
### 20.3 Exportieren von Ergebnissen der On-Board-Analyse

Wählen Sie **Export > Custom Export (Benutzerdefinierter Export) (Abbildung 34)**

Für Ergebnisse in Form einer Datei mit durch Komma getrennten Werten (.csv)

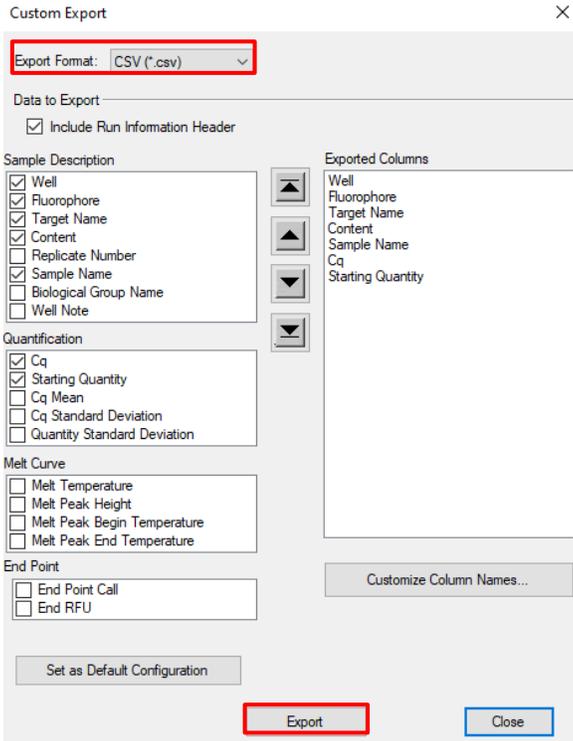
Für Ergebnisse als tabulatorgetrennte Textdatei (.txt)

Abbildung 34. Exportieren von Ergebnissen



Wählen Sie das gewünschte Exportformat (z. B. .csv oder .txt), wählen Sie die gewünschten Felder für den Export und klicken Sie auf **Export** (Abbildung 35).

Abbildung 35. Benutzerdefinierte Exporteinstellungen



The 'Custom Export' dialog box is shown. The 'Export Format' is set to 'CSV (\*.csv)'. The 'Data to Export' section has 'Include Run Information Header' checked. The 'Sample Description' section has 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', and 'Biological Group Name' checked. The 'Quantification' section has 'Cq' and 'Starting Quantity' checked. The 'Melt Curve' section has 'Melt Temperature', 'Melt Peak Height', 'Melt Peak Begin Temperature', and 'Melt Peak End Temperature' unchecked. The 'End Point' section has 'End Point Call' and 'End RFU' unchecked. The 'Exported Columns' list includes 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', 'Cq', and 'Starting Quantity'. The 'Export' button is highlighted with a red box.

#### 20.4 Interpretation der Ergebnisse mit der PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX) Analysesoftware

Die Auswertung der Daten kann mit der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX) Analysesoftware erfolgen. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Eine Anleitung zur Verwendung der **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480) Analysesoftware finden Sie in **Anhang A: Ergebnisinterpretation**.

## 21 Anhang A: Ergebnisinterpretation

Die Dateninterpretation erfordert die **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-Analysesoftware. Die SARS-CoV-2-Analysesoftware automatisiert die Auswertung der Amplifikationsergebnisse und optimiert den Arbeitsablauf.

Ausführliche Anweisungen zur **FastFinder**-Plattform finden Sie in der **Gebrauchsanweisung FastFinder Instructions for Use**, auf die Sie vom Menü **Help (Hilfe)** aus zugreifen können.

In **Tabelle 27** finden Sie Informationen zu geeigneter Analysesoftware für jedes Realtime-PCR-Instrument. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabelle 27. <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-Analysesoftware		
Best.-Nr.	Analysesoftware*	Realtime-PCR-Instrument
99021	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx & CFX96 Touch

\* Beachten Sie die Informationen auf der Website <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/>, um sicherzustellen, dass Sie die neueste Version der Analysesoftware verwenden.

**HINWEIS:** Bei der Übermittlung, Meldung und Speicherung von Ergebnissen sind die üblichen Laborverfahren zu befolgen, um den Verlust von Probanddaten zu vermeiden.

### 21.1 FastFinder-Plattform – IT-Mindestanforderungen

Die Analysesoftware ist auf der FastFinder-Plattform (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>) verfügbar. Die IT-Mindestanforderungen für die Installation der FastFinder-Plattform sind unten aufgeführt.

#### Hardware-Anforderungen

PC (Mac-Computer werden nicht unterstützt)

Prozessor: 2 GHz, 2 GB RAM

Festplattenspeicher: 10GB

Internetverbindung Kabel oder DSL, Proxy wird nicht unterstützt

Min. Bildschirmauflösung: 1366x768 Pixel

#### Unterstütztes Client-Betriebssystem

Betriebssystem      Unterstützte Versionen

Windows 10          32-Bit und 64-Bit

Windows 8.1        32-Bit, 64-Bit und ARM

Windows 8          32-Bit, 64-Bit und ARM

Windows 7 SP1     32-Bit und 64-Bit

Windows Vista SP2 32-Bit und 64-Bit

#### Unterstützte Browser

Benutzer des FastFinder-Administratorkontos benötigen einen der nachfolgenden Browser:

- Internet Explorer 11 oder neuere Version
- Microsoft Edge 25 oder neuere Version
- Firefox 45 oder neuere Version
- Google Chrome 47 oder neuere Version.

Es läuft möglicherweise auch auf älteren Versionen, aber diese werden nicht offiziell unterstützt.

## Software-Anforderungen

Für die Nutzung der FastFinder-Software ist mindestens .NET 4.6.1 erforderlich. Für weitere Informationen über das .NET Framework, besuchen Sie bitte die Hilfeseiten von Microsoft Windows.

## Antivirus-Einstellungen

Ihre Antiviren-Software könnte das FastFinder-Installationsprogramm (UgenTec.FastFinder.Installer.exe) in Quarantäne stellen. Bitte fügen Sie diese Datei der Antiviren-Whitelist hinzu. Beispiel: Symantec (Risiko: WS.Reputation.1)

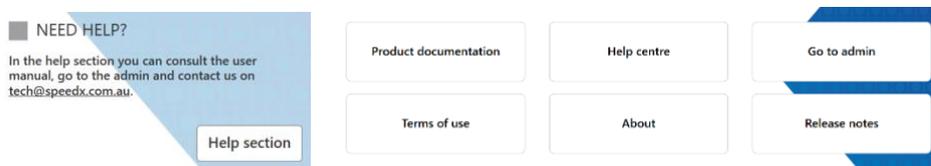
## Firewall-Anforderungen

https-Verbindungen sollten zu \*.fastfinderplatform.com:443 zugelassen werden

Ausführliche Anweisungen zur **FastFinder**-Plattform finden Sie in der Gebrauchsanweisung **FastFinder Instructions For Use**, auf die Sie vom Menü **Help** (Hilfe) aus zugreifen können.

So greifen Sie auf das Menü Help (Hilfe) zu:

- Öffnen Sie das Startmenü 
- Wählen Sie  oder den Abschnitt **Help** (Hilfe) aus und dann **Product Documentation** (Produktdokumentation) und **Instructions for Use** (Gebrauchsanweisung)



### 21.2 Device set up (Geräteeinrichtung) (neuer Benutzer oder Gerät)

Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung des Geräts finden Sie in der **Gebrauchsanweisung FastFinder Instructions for Use**, auf die Sie über das Menü **Help (Hilfe)** zugreifen können.

Öffnen Sie **FastFinder**.

- Wählen Sie **Devices (Geräte)** aus der Workflow-Leiste
  - > **Add (Hinzufügen)** auswählen
  - > Wählen Sie eine Datei (Ausführungsdatei) für das neue Gerät
- So ändern Sie das **Current directory (Aktuelles Verzeichnis)**:
  - > Wählen Sie **Browse (Durchsuchen)** und wählen Sie den Ordner aus, der die relevanten Dateien enthält
  - > Wählen Sie **Next (Weiter)**
- Fügen Sie Geräteinformationen hinzu
  - > Wählen Sie **Save (Speichern)**

#### 21.2.1 Colour Compensation (Farbkompensation)

**HINWEIS:** Weitere Informationen zur Colour Compensation (Farbkompensation) finden Sie in **Abschnitt 19.3**

Bei **LC480 II** Geräten muss eine Farbkompensationsdatei zum Gerät hinzugefügt werden.

- Wählen Sie das LC480 II-Gerät.
  - > Wählen Sie im Bereich **Colour Compensation (Farbkompensation)** die Option 
  - > Wählen Sie aus dem Verzeichnis die Colour Compensation (Farbkompensation)-Datei für das Gerät aus.
- So ändern Sie das Current directory (Aktuelles Verzeichnis):

- > Wählen Sie **Browse (Durchsuchen)** und wählen Sie dann den Ordner aus, der die relevanten Dateien enthält
- Wählen Sie **Next (Weiter)**.
- Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** aus der Liste, um eine Verknüpfung zu diesem Assay herzustellen.
- Wählen Sie **Save (Speichern)**

Neue oder zusätzliche Colour Compensation (Farbkompensation)-Dateien können je nach Bedarf zu Geräten hinzugefügt oder deaktiviert werden.

Im Bereich Colour Compensation (Farbkompensation) des Geräts

- Wählen Sie neben dem Dateinamen aus 
  - Wählen Sie , um eine Colour Compensation (Farbkompensation)-Datei für ein Assay zu aktivieren oder zu deaktivieren.
  - Wählen Sie **Save (Speichern)**

### 21.3 Assay-Plugin (neuer Benutzer)

Ausführliche Anweisungen zur Einrichtung von Assays finden Sie in der **Gebrauchsanweisung FastFinder Instructions for Use**, auf die Sie über das Menü **Help (Hilfe)** zugreifen können.

Öffnen Sie **FastFinder**.

- Wählen Sie **Assays** aus der Workflow-Leiste
- Wählen Sie **Add (Hinzufügen)**.
  - > Für LC480 II > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** aus der Liste
  - > Für CFX96 Dx und CFX96 Touch > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)** aus der Liste
- Wählen Sie **Add (Hinzufügen)**.

Zum Aktivieren bzw. Deaktivieren von Versionen eines Assay-Plugins

- Unter **General assay information (Allgemeine Assay-Informationen)**
  - > Wählen Sie  **Versions (Versionen)**
    - > Wählen Sie , um die Version des Assays zu aktivieren bzw. zu deaktivieren
    - > Wählen Sie **Save (Speichern)**

### 21.4 Sample Name (Probenname)

Einem Assay-Plugin können Probenbezeichnungen zugewiesen werden, um die Erkennung von Wells und Probenotypen für die Analyse zu automatisieren.

Wählen Sie **Assays** aus der Workflow-Leiste

- Wählen Sie in den Bezeichnungen für Probenotyp (Präfix) die Option 
  - > Wählen Sie , um Bezeichnungen für Probenotypen zu deren Definition hinzuzufügen (Negativkontrolle, Positivkontrolle/n und reguläre Probe).
  - > Geben Sie je nach Wunsch ein Wort, eine Abkürzung oder einen Buchstaben in das Textfeld ein
  - > Wählen Sie **Save (Speichern)**

- Wählen Sie unter "Mix definition nametags (suffix)" (Bezeichnungen für Gemischdefinition (Suffix)) die Option aus 
  - > Wählen Sie  zum Hinzufügen einer Bezeichnung zur Definition des Gemischnamens
  - > Geben Sie je nach Wunsch ein Wort, eine Abkürzung oder einen Buchstaben in das Textfeld ein
  - > Wählen Sie **Save (Speichern)**
- Weisen Sie in der Instrumentensoftware (vor oder nach Abschluss des Laufs) den entsprechenden Wells die gleiche Bezeichnung zu
  - > Für **LC480 II**: siehe Anweisungen **zur Programmierung von Probenbezeichnungen in der Ausführungsdatei in Abschnitt 19.**
  - > Für **CFX96 Dx** und **CFX96 Touch** finden Sie Anweisungen zur Programmierung von Probenbezeichnungen in der Ausführungsdatei **in Abschnitt 20.**

**HINWEIS:** Die Probenbezeichnungen unterscheiden zwischen Klein- und Großbuchstaben. Die Bezeichnung muss mit den in der Ausführungsdatei zugewiesenen Bezeichnungen identisch sein.

### 21.5 Hinzufügen von Lot (Charge)-Nummern des Gemischs

Dem Assay können Gemisch-Chargennummern zugewiesen werden, um die Verfolgbarkeit von Reagenzien zu ermöglichen.

- Wählen Sie **Assays** aus der Workflow-Leiste
  - > Unter **Assay Lot (Assay-Charge)**: Wählen Sie  aus, um eine neue Charge hinzuzufügen, oder , um eine bestehende Charge zu bearbeiten
  - > Nach dem Hinzufügen sind die Chargennummern im Analysemodul verfügbar

Wählen Sie  Show all lots  Show only active lots aus, um alle Chargennummern oder nur aktive Nummern anzuzeigen

### 21.6 Analyse

Wählen Sie in der Workflow-Leiste die Option **Analyses (Analysen)**, um eine neue Analyse zu starten

#### 1 Select datafile

Suchen Sie nach der Datei, die aus einem bestimmten Verzeichnis zur Analyse hochgeladen werden soll

- So ändern Sie das **Current directory (Aktuelles Verzeichnis)**:
  - > Wählen Sie **Browse (Durchsuchen)** und wählen Sie dann den Ordner aus, der die relevanten Dateien enthält
- Wählen Sie die Ausführungsdatei (mit den Ausführungsdaten) aus der Liste aus
  - > Wählen Sie **Next step (Nächster Schritt)**.

#### 2 Assign assay(s)

Weisen Sie die Assaydaten manuell der Platte zu, wenn die Probenbenennung nicht im **Assaymodul** eingerichtet wurde.

- Für **LC48 II** > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
- Für **CFX96 Dx** und **CFX96 Touch** > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
- Wählen Sie Wells aus und weisen Sie diese wie folgt zu:
  - > Normale Probe (S)
  - > Negativkontrolle (N)
  - > Positivkontrolle (P)

- Wählen Sie **Next step (Nächster Schritt)**.

So speichern Sie das Plattenlayout als Vorlage für die künftige Verwendung:

- Wählen Sie Wells aus und weisen Sie Proben Typen zu.
  - > Wählen Sie  aus, um die Vorlage zu speichern.
- Geben Sie der Vorlage einen Namen für die künftige Verwendung.
  - > Wählen Sie **Save (Speichern)**

So laden Sie eine zuvor gespeicherte Plattenvorlage:

- Wählen Sie  aus, um die Plattenvorlage zu laden
  - > Wählen Sie die Vorlage aus dem Dropdown-Menü.
  - > Markieren Sie das Kästchen, um die in der Plattenvorlage angegebenen Proben Typen zu laden.
  - > Wählen Sie **Load (Laden)**.

### 3 Configure assay(s)

- Für **LC480 II** > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
  - > Wählen Sie **Assay Lot (Assay-Charge)** aus dem Dropdown-Menü aus
  - > **Analyse (Analysieren)** auswählen
- Für **CFX96 Dx** und **CFX96 Touch** > Wählen Sie **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
  - > Wählen Sie **Assay Lot (Assay-Charge)** aus dem Dropdown-Menü aus
  - > **Analyse (Analysieren)** auswählen

## 21.7 Ergebnisse

In **Tabelle 28** finden Sie eine Übersicht über mögliche gemeldete Probenergebnisse.

**HINWEIS:** Es wird dringend empfohlen, die Amplifikationskurven für alle positiven Proben zu bestätigen.

So schließen Sie die Analyse ab und verhindern weitere Bearbeitungen durch Benutzer:

- > Wählen Sie **Authorise Analysis (Analyse genehmigen)**.
- > Wählen Sie zur Bestätigung **Yes (Ja)**.
- So weisen Sie die Analyse zurück oder starten sie neu:
  - > Wählen Sie **Restart Analysis (Analyse neu starten)** oder **Reject Analysis (Analyse zurückweisen)**.
  - > Wählen Sie die Bestätigungsoption aus.

## 21.8 Referenzkurve

Eine Referenzkurve kann gespeichert und für den Vergleich von Proben auf der gleichen Platte oder auf verschiedenen Platten verwendet werden.

- Wählen Sie die gewünschte Probe entweder im Menü **Well Details (Well-Details)** oder im Menü **Target Details (Target-Details)** aus
- Wählen Sie im Amplifikationsdiagramm-Menü > 

- > Markieren Sie das Kästchen für den gewünschten Kanal und fügen Sie eine Bezeichnung hinzu.
- > Wählen Sie **Save (Speichern)**, um ein Signal als Referenzkurve hinzuzufügen.

Diese Referenzkurve wird nun im Menü „**Assays**“ als mit dem Assay verknüpft angezeigt und kann jederzeit deaktiviert werden.

## 21.9 Übersicht der Ergebnisse

Tabelle 28. Ergebnisinterpretation der PlexPCR® SARS-CoV-2-Analysesoftware (Registerkarte „Results Overview“ (Ergebnisübersicht))					
Well	Name	Assay	Ergebnis	Cq-Werte	Gesamtergebnisse
A1	Sample 1_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positiv	RdRp: 25,94 IC:19,17	<b>Probe 1 – positiv</b> SARS-CoV-2 nachgewiesen.
A2	Sample 2_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negativ	IC: 18,82	<b>Probe 2 – negativ</b> SARS-CoV-2 nicht nachgewiesen. IK gültig
A3	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negativ	IK: 18,63	<b>N – Negativ</b> Negativkontrolle gültig.
A4	Sample 3_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ungültig		<b>Probe 3 – ungültig</b> IK ungültig. Probe erneut extrahieren und testen.
A5	Sample 4_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positiv	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IK: 18,79	<b>Probe 4 – positiv</b> SARS-CoV-2 nachgewiesen.
A6	Sample 5_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positiv	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IK: 18,79	<b>Probe 5 – positiv</b> SARS-CoV-2 nachgewiesen.
A7	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ungültig		<b>N – Ungültig</b> Negativkontrolle ungültig.
A8	Sample 6_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positiv	ORF1ab: 23,08 RdRp: 24,34 IK: 19,42	<b>Probe 6 – positiv</b> SARS-CoV-2 nachgewiesen.
A9	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positiv	ORF1ab: 18,98 RdRp: 19,97 IK: 18,39	<b>P – Positiv</b> Positivkontrolle gültig.
A10	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ungültig		<b>P – Ungültig</b> Positivkontrolle ungültig.
A11	Sample 7_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ungültig	IC: 18,83	<b>Sample 7_CoV – Ungültig</b> Fehler: Abnormale Veränderung des Fluoreszenzniveaus.
A12	Sample 8_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ungültig		<b>Sample 8_CoV – Ungültig</b> <b>Sample was rejected</b>

### 21.10 Exportieren von Ergebnissen

- So exportieren Sie Ergebnisse
  - > Wählen Sie in der Workflow-Leiste die Option **Exports (Exporte)**.
  - > Exportieren Sie eine oder mehrere der folgenden Berichtarten: **Cq values list (CSV) (Cq-Werteliste [CSV])**, **Results (CSV) (Ergebnisse [CSV])**, **Generic Amplification CSV (Generische Amplifikation CSV)** oder die entsprechende LIS-Integrationsdatei.
  - > Wählen Sie **Exports (Exporte)**.
- So laden Sie Exporte herunter
  - > Wählen Sie in der Workflow-Leiste die Option **Reports (Berichte)**.
  - > Wählen Sie die Dateien aus und speichern Sie diese.
- Exportieren Sie alternativ einen individuell angepassten Report
  - > Exportieren Sie eine **Amplification Curve Analysis (PDF) (Amplifikationskurvenanalyse [PDF])**.
  - > Wählen Sie, welche Daten enthalten sein sollen (Diagramme, Prüfpfad, Ergebnisübersicht).
  - > Wählen Sie die gewünschten Report-Einstellungen, um die Probenanforderung anzupassen.
- Wählen Sie **Exports (Exporte)**.
  - > Öffnen Sie diese zum Anzeigen, Speichern und Drucken in **Report Viewer (Bericht-Viewer)**.

## 22 Glossar



CE-Kennzeichnung  
Für die *In-vitro*-Diagnostik



Bestellnummer



Chargenbezeichnung



Autorisierter Vertreter  
Europäischen Gemeinschaft



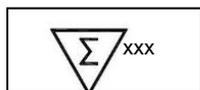
Hersteller



Herstellungsdatum



Temperaturbegrenzung



Inhalt ausreichend für  
xxx Bestimmungen



Verbrauchsdatum



Europäischer Importeur



Konformitätsprüfzeichen des  
Vereinigten Königreichs

SpeedX-Produkte unterliegen unter Umständen einem oder mehreren in- oder ausländischen Patenten. Unter [www.plexpcr.com/patents](http://www.plexpcr.com/patents) finden Sie umfassende Informationen zu den Patenten.

**PlexPCR**<sup>®</sup>, **PlexZyme**<sup>®</sup> und **PlexPrep**<sup>™</sup> sind Marken der Firma SpeedX. Andere Urheberrechte und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

© Copyright 2023 SpeedX Pty. Ltd.