

**IVD**

**Gebrauchsanweisung (Deutsch)**

**1 Zweckbestimmung**

Der *ampliCube* Coronavirus Panel ist ein qualitativer In-vitro-Test zum spezifischen Nachweis der RNA des Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), der RNA des neu aufgetretenen SARS-CoV-2, SARS-CoV sowie Bat SARS-like CoV und der RNA der humanen Coronaviren (HCoV) (NL63, OC43, 229E, HKU1) in humanem Sputum, Abstrich, BAL (Bronchoalveoläre Lavage) Trachealsekret oder Stuhl.

**2 Anwendungsbereich**

Das Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), und die humanen Coronaviren (HCoV) mit den Spezies NL63, OC43, 229E und HKU1 gehören zur Familie der *Coronaviridae* und sind als Erreger von leichten respiratorischen Infektionen bis hin zum schweren akuten Atemwegssyndrom von Bedeutung. Etwa ein Drittel aller Erkältungskrankheiten werden von HCoV hervorgerufen, häufiges Begleitsymptom ist Durchfall. Das MERS-CoV ist für das Middle East Respiratory Syndrome verantwortlich, die Erkrankung manifestiert sich als akute, oft schwer verlaufende, respiratorische grippeähnliche Erkrankung mit Lungenentzündung und Atemnot. Differentialdiagnostisch sollte MERS-CoV insbesondere dann in Betracht gezogen werden, wenn Kontakt zu MERS-CoV-infizierten Personen innerhalb der letzten 2 Wochen vor Erkrankungsbeginn in einem Land der arabischen Halbinsel bestand.

SARS-Coronaviren wie SARS-CoV-2 (ätiologischer Erreger der Pandemie COVID-19) verbreiten sich hauptsächlich durch Übertragung von Mensch zu Mensch über Tröpfchen in der Atemluft. Die Symptome können von Fieber, Husten und Atembeschwerden bis hin zu Lungenentzündung und akutem Atemnotsyndrom und schließlich zum Tod bei komorbiden Personen reichen.

Der *ampliCube* Coronavirus Panel findet seinen Einsatz zum Nachweis und Differenzierung zwischen MERS-CoV, SARS-CoV (im Besonderen SARS-CoV-2) und HCoV.

**3 Testprinzip**

Bei dem Test handelt es sich um ein Real-Time (Echtzeit) RT (Reverse Transkriptase) PCR-System. Es verwendet spezifische Primer und markierte Sonden für die Umschreibung der RNA in cDNA, Amplifikation und Detektion der RNA von MERS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV und HCoV (NL63, OC43, 229E, HKU1).

Um sicherzustellen, dass die aus der Patientenprobe isolierten Nukleinsäuren keine RT-PCR-inhibierenden Substanzen enthalten, wird der Probe während der Nukleinsäure-Isolierung eine Interne Kontrolle (IC) zugesetzt. Diese IC wird im selben PCR-Ansatz in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und detektiert. So können falsch negative Testergebnisse aufgrund einer Inhibition der RT-PCR-Reaktion ausgeschlossen werden. Gleichzeitig dient die IC als Nachweis der Nukleinsäure-Extraktion aus der Patientenprobe.

Sonden für die spezifische Detektion der erregerspezifischen Nukleinsäuren sind mit den Reporter-Farbstoffen FAM (MERS-CoV), HEX (SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV) und ATTO Rho 12 (HCoV) markiert, Sonden für die Detektion der Internen Kontrolle mit ATTO 647N. Dadurch ist die simultane Detektion aller Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz möglich.

Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

**4 Reagenzien**

**4.1 Packungsinhalt**

Die Reagenzien einer Packung reichen für 50 Bestimmungen. Jeder Reagenziensatz enthält:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl Primer & Probe-Mix für MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV und Interne Kontrolle (Deckelfarbe grün)
<b>ENZYME</b>	600 µl Enzym Mix (Deckelfarbe weiß) Enthält Reverse Transkriptase und DNA-Polymerase. (Komponente ist blau eingefärbt.)
<b>CONTROL INT</b>	250 µl Interne Kontrolle (Deckelfarbe farblos)
<b>CONTROL +</b>	170 µl Positivkontrolle (Deckelfarbe rot)
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl Negativkontrolle (Deckelfarbe blau)
<b>INSTRU</b>	1 Gebrauchsanweisung

**4.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte**

- Je nach verwendetem Real-Time PCR-Cycler stellt MIKROGEN Reagenzien zur Farbstoffkalibrierung zur Verfügung: MIKROGEN *ampliCube* Color Compensation (LightCycler® 480 II (Roche) Artikel-Nr. 50502), MIKROGEN *ampliCube* Color Compensation (cobas z 480 Analyzer (Roche) Artikel-Nr. 50503), oder das Farbstoffkalibrierungsset für den CFX96 (Bio-Rad, Artikel-Nr. 50505). Bei Abarbeitung am Mic (bms) PCR-Cycler stellt MIKROGEN Mic-Assay-Templates zur Verfügung.
- Nukleinsäure-Extraktion: Es werden folgende Nukleinsäure-Extraktionssysteme empfohlen: MagNA Pure® System, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) oder *alphaClean* Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN) mit Abarbeitung am M32-, M48- oder M96-Extractor (Bio-comma)
- Real-Time Cycler: LightCycler® 480 II (Roche), cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms), Rotor-Gene Q (Qiagen)
- 96-Well PCR-Platten und Folien: Empfehlungen des Real-Time PCR-Cycler-Herstellers beachten
- Mikropipetten mit Einwegspitzen mit Filter 10 µl, 20 µl, 100 µl und 1000 µl
- Vortex-Mixer mit hoher Drehzahl (empfohlen 3200 rpm)
- Mini-Zentrifuge
- Ggf. Plattenzentrifuge
- PBS oder H<sub>2</sub>O (*PCR grade*) bei Verwendung von Nylon-Flockfaser-Abstrichupfern ohne Transportmedium
- Einweg-Schutzhandschuhe puderfrei
- Kühlblock

**5 Haltbarkeitsdauer und Handhabung**

- Reagenzien vor und nach Gebrauch zwischen -25 °C und -18 °C lagern.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Komponenten (mehr als zehnmal) muss vermieden werden. Aliquotierung der Testkomponenten nach dem ersten Auftauen wird empfohlen.
- Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (+2 °C bis +8 °C).
- Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.
- Vor Testbeginn alle Reagenzien vollständig auftauen, mischen (kurzes Vortexen) und abzentrifugieren.
- Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.
- Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.
- Bei substanziellen Änderungen am Produkt bzw. der Anwendungsvorschrift durch den Anwender kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.
- Kreuzkontamination kann zu falschen Testergebnissen führen. Fügen Sie Patientenproben und Kontrollen sorgfältig zu. Achten Sie darauf, dass Reaktionsansätze nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden.

**6 Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen**

- Nur für die In-vitro-Diagnostik verwenden.
- Sämtliche Patientenproben müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Während des gesamten Testverfahrens müssen geeignete Einweg-Handschuhe getragen werden.
- Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder entsprechend den Hygienevorschriften entsorgt werden. Die Konzentrationsangaben und Inkubationszeiten der Hersteller müssen beachtet werden.
- Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien nicht mit Reagenzien aus anderen Kit-Chargen, anderen MIKROGEN PCR-Kits oder mit Reagenzien anderer Hersteller.
- Vor Durchführung des Tests die gesamte Gebrauchsanweisung durchlesen und sorgfältig befolgen. Abweichungen vom in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Testprotokoll können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

## 7 Probenentnahme und Reagenzien-Vorbereitung

### 7.1 Probenmaterial

Ausgangsmaterial für den ampliCube Coronavirus Panel ist RNA extrahiert aus Sputum, Abstrich, BAL, Trachealsekret oder Stuhl humanen Ursprungs. Die Qualität der Nukleinsäurepräparation hat Einfluss auf das Testergebnis. Es muss sichergestellt werden, dass die gewählte Extraktionsmethode vereinbar mit der Real-Time PCR-Technologie ist.

#### 7.1.1 Probenvorbereitung

Bei Verwendung eines Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfers ohne Transportmedium:

1. Inkubieren Sie den Abstrichtupfer in 0,5 ml PBS (bei Extraktion mittels MagNA Pure® System) oder in 0,5 ml H<sub>2</sub>O (bei Extraktion mittels alphaClean Mag RNA/DNA) für 5 Min. bei Raumtemperatur.
2. Verwerfen Sie den Tupfer und verwenden Sie die PBS- bzw. H<sub>2</sub>O-Suspension für die Nukleinsäure-Extraktion.

### 7.2 Extraktion der Nukleinsäuren

Extrahieren Sie die Nukleinsäuren aus der Patientenprobe und der Negativkontrolle (NC). Wir empfehlen ein Startvolumen für die Extraktion von 200 µl und ein Elutionsvolumen von 50 µl bzw. 100 µl je nach Extraktionssystem. Extraktionen (MagNA Pure® System (Roche) aus 400 µl Startmaterial in 100 µl eluiert zeigten vergleichbare Ergebnisse. Folgen Sie den Anweisungen des Herstellers des Extraktionskits.

1. Tauen Sie die Interne Kontrolle (IC) (Deckelfarbe farblos) und die Negativkontrolle (NC) (Deckelfarbe blau) auf.  
**Stellen Sie sicher, dass die IC und die NC vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die IC und die NC vor Gebrauch durch kurzes Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!**
2. Fügen Sie bei der Extraktion jeder Patientenprobe und der NC 5 µl IC zu. Die IC soll dem Proben-Lysepuffer-Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugesetzt werden.
3. Extrahieren Sie die Patientenproben und die NC. (Hinweis: die NC kann nicht ohne Extraktion in die PCR eingesetzt werden!)
4. Die Positivkontrolle wird nicht extrahiert.

Folgendes Nukleinsäure-Extraktionssystem wird empfohlen und wurde für die Leistungsbewertung verwendet:

Extraktionssystem	Probenvolumen	Elutionsvolumen
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction System (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Möchten Sie andere Extraktionsmethoden verwenden, so wenden Sie sich bitte an den Hersteller, um die Kompatibilität zu klären.

### 7.3 Ansetzen des Mastermixes

1. Tauen Sie den Primer & Probe-Mix (Deckelfarbe grün) und den Enzym Mix (Deckelfarbe weiß) auf. Schützen Sie dabei die Reagenzien vor Licht.  
**Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!**
2. Setzen Sie den Mastermix nach folgendem Pipettierschema an:

Komponente	Mastermix für 1 Reaktion
Primer & Probe-Mix	3 µl
Enzym Mix	12 µl
Gesamtvolumen	15 µl

3. Mischen Sie den kompletten Mastermix durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab.
4. Legen Sie 15 µl Mastermix für jede PCR-Reaktion vor.


### 7.4 Ansetzen der RT-PCR-Reaktion


1. Tauen Sie die Positivkontrolle (PC) (Deckelfarbe rot) auf.  
**Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!**

Komponente	1 Reaktion
Mastermix aus 7.3	15 µl
Proben-Eluat oder Eluat der NC oder die PC	10 µl

2. Pipettieren Sie je 10 µl des Proben-Eluates zu 15 µl Mastermix.
3. Pipettieren Sie 10 µl der Positivkontrolle (nicht präpariert) zu 15 µl Mastermix.
4. Pipettieren Sie 10 µl des Eluates der Negativkontrolle zu 15 µl Mastermix.

Jeder Lauf muss eine Positiv- und eine Negativkontrolle beinhalten! Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer adhäsiven, optischen Folie bzw. die Reaktionsgefäße mit den vorgesehenen Deckeln.

 Die PCR-Platten bzw. Reaktionsgefäße müssen **mind. 5 Sek.** mit maximaler Drehzahl gevortext und anschließend kurz zentrifugiert werden.

 PCR-Reaktionsgefäße für den **Mic PCR-Cycler** müssen **mind. 10 Sek.** mit maximaler Drehzahl gevortext werden.

## 8 Programmierung des Real-Time Cyclers

Der ampliCube Coronavirus Panel wurde mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) evaluiert und am cobas z 480 Analyzer (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms) und Rotor-Gene Q (Qiagen) validiert.

### 8.1 Einstellung der Detektionskanäle

#### LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Anregung	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm

Beim LightCycler® 480 Instrument II (Roche) ist es notwendig, vorab eine Color Compensation (Artikel-Nr. 50502) zu verwenden, die von MIKROGEN zur Verfügung gestellt wird.

#### cobas z 480 Analyzer (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Anregung	465 nm	540 nm	540 nm	610 nm
Emission	510 nm	580 nm	610 nm	670 nm

Beim cobas z 480 Analyzer (Roche) ist es notwendig, vorab eine Color Compensation (Artikel-Nr. 50503) zu verwenden, die von MIKROGEN zur Verfügung gestellt wird.

#### CFX96 (Bio-Rad)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Modus	All channels			

Die Datenaufnahme und -auswertung am CFX96 erfolgt mit der Methode *calc / data acquisition mode: all channels*. Eine Kalibrierung des CFX96 (Bio-Rad) muss für ATTO Rho12 und ATTO 647N vorab durchgeführt werden. Von MIKROGEN erhalten Sie das benötigte Farbstoffkalibrierungsset (CFX96 (Bio-Rad), Artikel-Nr. 50505).

### QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Anregung	X1 / 470 nm	X2 / 520 nm	X4 / 580 nm	X5 / 640 nm
Emission	M1 / 520 nm	M2 / 558 nm	M4 / 623 nm	M5 / 682 nm
Quencher	[none]	[none]	[none]	[none]

Wählen Sie unter Settings 1. Run mode „standard“, 2. Reference dye „none“, 3. Experiment type „custom“.

### Mic (bms)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot

MIKROGEN stellt Ihnen für die Abarbeitung validierte Mic-Assay-Templates zur Verfügung. Bitte verwenden Sie ausschließlich die MIKROGEN Mic-Assay-Templates. Die aktuellen MIKROGEN Mic-Assay-Templates sind auf der MIKROGEN Homepage ([www.mikrogen.de](http://www.mikrogen.de)) zum Download frei verfügbar.

### Rotor-Gene Q (Qiagen)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Anregung	470 nm	530 nm	585 nm	625 nm
Emission	510 nm	555 nm	610 nm	660 nm
Gain	5	5	5	5

### 8.2 PCR-Programm

Reverse Transkription	50 °C	8 Min.
Denaturierung	95 °C	3 Min.
<b>Amplifikation</b>	<b>45 Zyklen</b>	
• Denaturierung	95 °C	10 Sek.
• Annealing/Elongation	60 °C	45 Sek.

Grundlegende Informationen zur Programmierung der verschiedenen Real-Time Cycler entnehmen Sie bitte der Anleitung des verwendeten Cyclers. Für spezielle Informationen zur Programmierung des Real-Time PCR-Cyclers bei Verwendung des ampliCube Coronavirus Panel kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

## 9 Ergebnisse

Die Datenauswertung am LightCycler® 480 II erfolgte mit der *Abs Quant/2nd Derivative Max* Methode.

### 9.1 Validierung

- Die Negativkontrolle muss unterhalb des *Thresholds* liegen. Die Interne Kontrolle (IC) in der Negativkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Zeigt die Negativkontrolle einen positiven Kurvenverlauf (Kontamination) oder ist die IC in der Negativkontrolle nicht valide, ist der Testlauf nicht auswertbar.
- Die Positivkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der Ct-Wert der Positivkontrolle muss < 33 sein. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation.
- Die Interne Kontrolle (IC) bei negativen Proben muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Das Signal der IC einer Patientenprobe muss mit dem Signal der IC in der extrahierten Negativkontrolle verglichen werden. Ein Unterschied von > +3 für den Ct-Wert der IC einer Probe im Vergleich zur IC der Negativkontrolle oder das Fehlen eines IC-Signals in der Probe können auf signifikante Inhibition der PCR-Reaktion hinweisen. In diesen Fällen ist ein negatives Testergebnis nicht valide.

### 9.2 Auswertung

Die Auswertung der Daten kann mit der entsprechenden PCR-Cycler-Software oder einer speziell von MIKROGEN unterstützten Software-Lösung zur automatisierten PCR-Auswertung und Interpretation erfolgen. Bei Verwendung eines LightCycler® 480 II kann die Auswertung entweder mittels *Abs Quant/2nd Derivative Max* Methode (empfohlen) oder mittels *Abs Quant/Fit Points* Methode erfolgen. Weitere Informationen und entsprechende Anleitungen erhalten Sie auf Anfrage bei MIKROGEN.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)	
Farbe	grün	gelb	orange	rot	
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N	
Auswertung mit	LightCycler 480 II	465-510	533-580	533-610	618-660
	cobas z 480	465-510	540-580	540-610	610-670
	CFX96	FAM	HEX	ROX	Cy5
	QuantStudio 5	FAM	VIC	ROX	ATTO 647N
	Mic	FAM	HEX	ROX	Cy5
Rotor-Gene Q	green	yellow	orange	red	

Signale größer als der *Threshold* werden als positive Ergebnisse gewertet. Leere Felder in der Tabelle gelten als negatives Ergebnis.

Farbe	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Interne Kontrolle (IC)
grün	positiv	---	---	---
gelb	---	positiv	---	---
orange	---	---	positiv	---
rot	---	---	---	positiv*

\* Im Falle positiver Signale in den Detektionskanälen der Pathogene wird das Signal der Internen Kontrolle nicht für die Testinterpretation benötigt. Eine hohe Erregerlast in der Patientenprobe kann zu einem verminderten oder fehlenden Signal für die Interne Kontrolle führen.

## 10 Grenzen der Methode, Einschränkungen

- Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Therapeutische Konsequenzen der Befundung sind im Zusammenhang mit den klinischen Daten zu ziehen.
- Ein negatives MERS-CoV, SARS-CoV-2 / SARS-CoV / Bat SARS-like CoV oder HCoV Testresultat kann eine Infektion mit den jeweiligen Erregern nicht ausschließen.

## 11 Leistungsmerkmale

### 11.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität wurden anhand von definiert positiven und definiert negativen Proben bestimmt.

Tabelle 1: Definiert positive Proben

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=4)	SARS-CoV-2 (n=126)	HCoV (n=17)
Negativ	0	3	0
Positiv	4	123	17
<b>Sensitivität [%]</b>	<b>100</b>	<b>97,62</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b> Konfidenzintervall (engl. Confidence interval)	<b>51,01 – 100</b>	<b>93,23 – 99,19</b>	<b>81,57 – 100</b>

Tabelle 2: Definiert negative Proben

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=24)	SARS-CoV-2 (n=490)	HCoV (n=24)
Negativ	24	486	24
Positiv	0	4	0
<b>Spezifität [%]</b>	<b>100</b>	<b>99,18</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b> Konfidenzintervall (engl. Confidence interval)	<b>86,20 – 100</b>	<b>97,92 – 99,68</b>	<b>86,20 – 100</b>

## 11.2 Analytische Sensitivität

### 11.2.1 Nachweisgrenze (LoD) in Kopien/PCR

Die Nachweisgrenze (LoD) des ampliCube Coronavirus Panel wurde mit Verdünnungsreihen von gBlock-DNA bekannter Konzentration auf einem LightCycler® 480 II System (Roche) ermittelt. Die 95%-Nachweisgrenze wurde mittels Probit Regressionsanalyse mit der CombiStats™ Version 5.0 Software (Council of Europe) bestimmt. Anschließend wurde die Nachweisgrenze mit jeweils 20 Replikaten an der LoD bestätigt.

**Tabelle 3a:** Nachweisgrenze (LoD) MERS und HCoV in Kopien/PCR

	MERS-CoV	HCoV
LoD [Kopien/PCR] 95%-Detektionslimit	4,14	12,41*
95% CI [Kopien/PCR] Konfidenzintervall (engl. confidence interval)	2,75 – 9,43	8,93 – 22,59

\* Angaben beziehen sich auf HCoV OC43, des Weiteren wurde HCoV 229E, NL63 und HKU1 getestet. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 20,54 und 89,48.

**Tabelle 3b:** Nachweisgrenze (LoD) SARS-CoV-2/SARS-CoV/Bat SARS-like CoV in Kopien/PCR

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV
LoD [Kopien/PCR] 95%-Detektionslimit	2,9	6,74	6,35
95% CI [Kopien/PCR] Konfidenzintervall (engl. confidence interval)	1,9 – 6,4	4,12 – 14,68	4,14 – 14,43

### 11.2.2 Nachweisgrenze (LoD) SARS-CoV-2 in Internationalen Units

Zusätzlich wurde die LoD für die SARS-CoV-2 Zielregionen mit drei unabhängigen Verdünnungsreihen (je 7 Verdünnungsstufen) mittels des WHO-Standard (First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146)) inkl. Nukleinsäure-Extraktion (*alpha*-Clean Mag RNA/DNA Kit am M96 Biocomma) auf einem LightCycler® 480 II System (Roche) und anschließender Probit Regressionsanalyse (CombiStats™ Version 6.0 Software (Council of Europe)) bestimmt. Die Nachweisgrenze des ampliCube Coronavirus Panel wird in Internationalen Units (IU) pro µl eingesetzten WHO-Standard angegeben.

**Tabelle 3c:** Nachweisgrenze (LoD) SARS-CoV-2 in IU/µl WHO-Standard

	SARS-CoV-2
LoD [IU/µl] 95%-Detektionslimit	2,72
95% CI [IU/µl] Konfidenzintervall (engl. confidence interval)	1,53 – 6,55

## 11.3 Analytische Spezifität

Die BLAST Suche ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) zeigt, dass die ausgewählten Primer und Sonden des ampliCube Coronavirus Panel die ausgewählten Pathogene spezifisch detektieren. Darüber hinaus wurde die Spezifität durch Untersuchung genomischer DNA/RNA von weiteren humanpathogenen Bakterien und Viren ermittelt.

**Tabelle 4:** Bakterien und Viren, die getestet wurden, um die analytische Spezifität des ampliCube Coronavirus Panel zu zeigen.

Bakterien	Viren
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Cytomegalovirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Enterovirus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Epstein-Barr Virus
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A
	Influenza B
	Measles Virus
	Mumps Virus
	Parainfluenzavirus
	Respiratory syncytial virus (RSV) A
	Rhinovirus 58 (A)

Keine dieser Proben zeigte ein positives Signal. Die im ampliCube Coronavirus Panel verwendeten Primer und Sonden zeigten keine Kreuzreaktionen mit den in Tabelle 4 aufgeführten Erregern. Die Interne Kontrolle (IC) war bei allen Testungen valide.

## 11.4 Äquivalenz verschiedener Probenmaterialien

Bestimmt wurde der Variationskoeffizient (VK) des Ct-Wertes zwischen Wasser und dem Extrakt des jeweiligen Probenmaterials nach Zugabe von Plasmid-DNA bekannter Konzentration.

**Tabelle 5:** Äquivalenz verschiedener Probenmaterialien

	MERS-CoV	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV	HCoV
VK [%] (BAL, H <sub>2</sub> O)	1,37	2,11	1,62	2,21	0,58
VK [%] (Sputum, H <sub>2</sub> O)	2,42	2,32	1,54	3,42	1,91
VK [%] (Abstrich, H <sub>2</sub> O)	1,51	1,28	1,47	1,50	1,08
VK [%] (Stuhl, H <sub>2</sub> O)	1,94	1,33	1,28	1,98	0,85






Der Variationskoeffizient (VK), basierend auf dem Ct-Wert (*cycle threshold*) zwischen Wasser und den Nukleinsäure-Extrakten (gewonnen aus den verschiedenen Probenmaterialien), war bei allen Zielgenen  $\leq 3,42\%$ .

## 12 Literatur


- L.-Y. Chang et al. (2006): Lack of Association between Infection with a Novel Human Coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki Disease in Taiwan. *The Journal of Infectious Diseases*, Jan. 2006, 193:283-6, 0022-1899/2006/19302-0015\$15.00
- L. Louie et al. (2006): Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Stool Specimens by Commercially Available Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2006, Vol. 44, No. 11, p. 4193-4193, doi:10.1128/JCM.01202-06
- F. Esper et al. (2005): Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, Feb. 2005, 191:492-8, 0022-1899/2005/19104-0002\$15.00
- F. Esper et al. (2010): Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Virology*, March 2010, Vol. 48, p. 131-133, doi:10.1016/j.jcv.2010.03.007
- M. Jevšnik et al. (2013): Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology Journal*, 2013, 10:46, doi:10.1186/1743-422X-10-46
- I. M. Mackay et al. (2015): MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, Dec. 2015, 12:222, DOI 10.1186/s12985-015-0439-5
- M. C. Nunes et al. (2014): Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, Feb. 2014, Vol. 9, Issue 2, e86448
- L. A. Sipulwa (2016): Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009–2012. *Virology Journal*, 13:18, DOI 10.1186/s12985-016-0474-x
- I. Wilhelmi (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, April 2003, Vol. 9, No. 4, p. 247-262
- F. Wu et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3
- R. Ralph et al. (2020): 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14(1):3-17
- W. G. Carlos et al. (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 2020 Vol. 201, P7-P8
- S.-Q. Deng et H.-J. Peng (2020): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 575-584
- Muenchhoff Maximilian, Mairhofer Helga, Nitschko Hans, Grzimek-Koschewa Natascha, Hoffmann Dieter, Berger Annemarie, Rabenau Holger, Widera Marek, Ackermann Nikolaus, Konrad Regina, Zange Sabine, Graf Alexander, Krebs Stefan, Blum Helmut, Sing Andreas, Liebl Bernhard, Wölfel Roman, Ciesek Sandra, Drosten Christian, Protzer Ulrike, Boehm Stephan, Keppler Oliver T. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(24):pii=2001057. <https://doi.org/10.2807/15677917.ES.2020.25.24.2001057>
- Ute Eberle, Clara Wimmer, Ingrid Huber, Antonie Neubauer-Juric, Giuseppe Valenza, Nikolaus Ackermann, Andreas Sing (for the Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team), Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Springer, published online: 29 January 2021, <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9>

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zu.

### 13 Erläuterung der Symbole

	Inhalt ist ausreichend für <n> Ansätze Anzahl der Ansätze
<b>P&amp;P MIX</b>	Primer & Probe-Mix
<b>ENZYM</b>	Enzym Mix
<b>CONTROL INT</b>	Interne Kontrolle
<b>CONTROL +</b>	Positivkontrolle
<b>CONTROL -</b>	Negativkontrolle
<b>INSTRU</b>	Gebrauchsanweisung
	Gebrauchsanweisung beachten
<b>CONT</b>	Inhalt, enthält
<b>IVD</b>	In-vitro-Diagnostikum
<b>LOT</b>	Chargen-/Versionsnummer
<b>REF</b>	Bestell-Nummer
	Verwendbar bis Verfallsdatum
	Lagerung bei x°C bis y°C
	Hersteller

### 14 Hersteller- und Versionsdaten

<b>ampliCube Coronavirus Panel</b>		Artikel-Nr. <b>50142</b>
<b>Gebrauchsanweisung</b> gültig ab		GAACCV004D 2023-04
	<b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de	
		<b>CE</b>



GAACCV004