

# SARS-CoV-2 RealFast™ Assay

REF 8-410 / 8-412  $\Sigma$  100 / 500 Reaktionen  
-30°C / -15°C CE IVD



ViennaLab Diagnostics GmbH  
Gaudenzdorfer Guertel 43-45  
A-1120 Vienna, Austria  
Phone: (+43-1) 8120156-0  
[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)  
[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Verwendungszweck

Der SARS-CoV-2 RealFast™ Assay ist ein multiplex, reverse transcription real-time PCR (RT-PCR) Test zur qualitativen und einstufigen Erkennung des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Das Vorhandensein von SARS-CoV-2 spezifischer RNA in Atemwegsproben ist mit der Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) assoziiert. Der Kit dient zur Testung von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine SARS-CoV-2-Infektion besteht. Der Assay-Mix zielt auf das N und das RdRP/ORF1ab Gen von SARS-CoV-2 ab, und detektiert gleichzeitig das humane ACTB-Gen um die Effizienz von Nukleinsäureextraktion und RT-PCR zu überprüfen. Zur Verwendung für humane *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. Einleitung

SARS-CoV-2 ist ein einzelsträngiges RNA Virus in Plusstrangorientierung, das erstmals Ende 2019 in der chinesischen Region Wuhan auftrat. Innerhalb von zwei Monaten verbreitete es sich weltweit, und COVID-19 wurde von der Weltgesundheitsorganisation WHO im März 2020 zur Pandemie erklärt. Die Krankheit ist bei der Mehrzahl der Patienten durch leichte, grippeähnliche Symptome (z.B. Fieber, Müdigkeit, Auswurf, Halsschmerzen, Kopfschmerzen, Durchfall und Erbrechen) gekennzeichnet. Bei einem kleinen Teil der infizierten Personen tritt jedoch ein schwerer bis kritischer Krankheitsverlauf mit Atemnot auf, was zu einer Gesamtmortalität von 0.2 bis 1.0% führt. Menschen über 65 und/oder mit bereits bestehenden Vorerkrankungen sind besonders gefährdet. Kritisch ist, dass ungefähr 40% bis 45% aller mit SARS-CoV-2 Infizierten asymptomatisch bleiben, das Virus aber trotzdem auf andere Menschen übertragen können. Aufgrund dieser stillen Ausbreitung ist es wichtig, Personen auch ohne klinische oder subklinische Symptome zu testen falls sie vermutlich SARS-CoV-2 ausgesetzt waren, um die Pandemie lokal, regional und global zu kontrollieren.

## 3. Kit Bestandteile 100 / 500 Rxn

RealFast™ 4x RT-PCR Mix 1 Via weisser Decke 500 / 2x 1,250 µl  
RealFast™ RTase 1 Via gelber Deckel 100 / 2x 250 µl  
SARS-CoV-2 Assay Mix 1 Via violetter Deckel 400 / 2x 1,000 µl  
SARS-CoV-2 Pos. Control 1 Via roter Deckel 500 / 500 µl

Die RealFast™ RTase ist eine thermostabile Reverse Transkriptase, die eine schnelle und effiziente cDNA-Synthese ermöglicht. RealFast™ 4x RT-PCR Mix umfasst HotStart Taq DNA Polymerase und dNTPs in einem optimierten Puffersystem. Der SARS-CoV-2 Assay Mix besteht aus Primern und doppelt-markierten Hydrolysesonden, die das SARS-CoV-2 N und RdRP/ORF1ab Gen sowie das humane ACTB-Gen abdecken.

Der Kit beinhaltet Reagenzien für 100 / 500 Reaktionen mit je 20 µl Endvolumen.

## 4. Lagerung und Stabilität

Lagern Sie den SARS-CoV-2 RealFast™ Assay nach Erhalt bei -30°C bis -15°C. Die Reagenzien überdauern ohne Aktivitätsverlust bis zu 10 Einfrier-/Auftauzyklen. Vermeiden Sie längere Exposition gegenüber direktem Licht. Bei korrekter Lagerung behält der Kit seine volle Funktionsfähigkeit bis zum angegebenen Ablaufdatum.

## 5. Produktbeschreibung

### 5.1. Testprinzip

Der Test erfolgt in einem einzelnen Röhrchen und umfasst einen reversen Transkriptionsschritt, gefolgt von drei simultanen fluorogenen 5'-Nuklease (TaqMan®) Assays. Der Assay Mix enthält genspezifische Primerpaare, die ein 107 nt Fragment des SARS-CoV-2 RdRP/ORF1ab Gens, ein 67 nt Fragment des SARS-CoV-2 N Gens und ein 101 nt Fragment des transkribierten humanen ACTB amplifizieren, sowie fluoreszenzmarkierte Hydrolysesonden, die an die Zielsequenzen der amplifizierten Fragmente hybridisieren. Die unmittelbare Nähe von 5'-Fluoreszenzreporter und 3'-Quencherfarbstoff unterdrückt die Fluoreszenz der intakten Sonde. Während des Extensionsschrittes der PCR spaltet die 5' – 3' Exonuklease Aktivität der Taq DNA-Polymerase den Reporter von der hybridisierten Sonde ab. Die räumliche Trennung des Fluorophors vom Quencher verursacht in Echtzeit ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur Menge des PCR-Produkts ist.

| Hydrolysesonde          | Fluorophor | Kanal  |
|-------------------------|------------|--------|
| N Gen (viral)           | FAM        | 520 nm |
| RdRP/ORF1ab Gen (viral) | HEX        | 556 nm |
| ACTB Gen (human)        | Cy5        | 670 nm |

In SARS-CoV-2 positiven klinischen Proben erzeugen die virusspezifischen Sonden Fluoreszenzsignale in den FAM und HEX Kanälen. Aufgrund des häufigen Vorhandenseins von humaner RNA in der extrahierten Probe tritt auch ein Signal im Cy5-Kanal auf. In negativen Proben erzeugt die ACTB-spezifische Sonde ein starkes Fluoreszenzsignal im Cy5 Kanal, während im FAM und HEX-Kanal kein oder nur ein

Basissignal beobachtet werden kann. Informationen zur Interpretation alternativer Signalmuster finden Sie in der Tabelle in Abschnitt 8.

### 5.2. Kompatibilität mit real-time PCR Geräten

Der SARS-CoV-2 RealFast™ Assay ist für die Verwendung mit verschiedenen handelsüblichen real-time PCR Geräten, die FAM-, HEX- und Cy5-Fluoreszenz detektieren können, validiert:

- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ ABI 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ MIC qPCR Cycler (bms)

Der Kit **eignet sich nicht** für die Verwendung mit real-time PCR Geräten ohne geeignete Fluoreszenzdetektionskanäle.

### 5.3. Testspezifikationen

Die **Sensitivität** wurde anhand von 73 Abstrichproben bestimmt, die mit einem CE-markierten Referenztest positiv auf SARS-CoV-2 Sequenzen getestet wurden. Der SARS-CoV-2 RealFast™ Assay bestimmte 73/73 Proben als positiv, was einer Richtig-Positiv-Rate von 100% entspricht.

Die **Spezifität** wurde anhand von 148 Abstrichproben bestimmt, die mit einem CE-markierten Referenztest negativ auf SARS-CoV-2 Sequenzen getestet wurden. Der SARS-CoV-2 RealFast™ Assay bestimmte 146/148 Proben als negativ, was einer Richtig-Negativ-Rate von 98.65% entspricht.

Empfohlenes Eingangsvolumen: 10 µl viraler RNA Extrakt.

Detektionslimit: 10 SARS-CoV-2 Kopien pro Reaktion, bestimmt durch Analyse von log. Verdünnungsreihen einer synthetischen SARS-CoV-2 RNA Kontrolle mit SARS-CoV-2 negativer RNA Mischung aus humanen naso-/oropharyngealen Abstrichproben. Typischerweise wird erwartet, dass Proben, die 10 SARS-CoV-2 Kopien enthalten (d.h. 1 SARS-CoV-2 Kopie/µl Eingangs-RNA), den Schwellenwert bei Cq 38.5 +/- 1.5 überschreiten.

## 6. Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien

Real-time PCR Gerät mit FAM (520 nm), HEX (556 nm) und Cy5 (660nm) Filter, gerätekompabile optische PCR-Gefäße, puderfreie Einweghandschuhe, Vortexer, Minizentrifuge für 2.0 ml Röhrchen, Röhrchenständer, Set kalibrierter Mikropipetten (0.5 – 1000 µl), sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter, hochreines Wasser, Virus-RNA Extraktionssystem, Gefrierschrank, Abfallbehälter für gefährlichen Biomüll.

## 7. Arbeitsanleitung

### 7.1. RNA Extraktion

RNA Extraktionsreagenzien sind **nicht im Kit** enthalten..

Es kann RNA isoliert aus naso-/oropharyngealen Abstrichen und Gurgelproben verwendet werden. Bitte befolgen Sie die entsprechenden Laborsicherheitsrichtlinien (z.B. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>) für die Handhabung und Verarbeitung von Proben im Zusammenhang mit COVID-19. Um die maximale analytische Empfindlichkeit zu erreichen, wird dringend empfohlen die RT-PCR Reaktion unmittelbar nach der RNA Extraktion anzusetzen.

### 7.2. PCR Kontrollen

Schließen Sie in jedem Lauf **immer** eine **No Template Control** (NTC) zur Kontrolle potentieller Kontaminationen mit ein. Es ist empfehlenswert die NTC (hochreines Wasser anstelle von DNA) als Duplikat einzusetzen.

Führen Sie in jedem Lauf **immer** die **SARS-CoV-2 Pos. Control** als positives Referenzsignal für unbekannte Proben mit.

» **Anmerkung:** SARS-CoV-2 Pos. Control stellt eine potentielle Kontaminationsquelle dar und muss daher mit größter Sorgfalt gehandhabt werden. «

### 7.3. Vorbereitung des SARS-CoV-2 RealFast™ Master-Mixes

Alle Lösungen komplett auftauen, kurz vortexen (SARS-CoV-2 Assay Mix) oder mehrmals vorsichtig kippen (RealFast™ 4x RT-PCR Mix und RealFast™ RTase) und kurz abzentrifugieren. Das Ansetzen der RT-PCR erfolgt auf Eis oder Kühlblöcken. Bereiten Sie ausreichend **Master-Mix** für die Gesamtzahl der geplanten PCR Ansätze (N Proben + Kontrollen) vor, und berücksichtigen Sie bis zu 25% Überschuss um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen:

| Komponente              | pro Reaktion | z.B. 16+4 Reaktionen |
|-------------------------|--------------|----------------------|
| SARS-CoV-2 Assay Mix    | 4 µl         | 80 µl                |
| RealFast™ 4x RT-PCR Mix | 5 µl         | 100 µl               |
| RealFast™ RTase         | 1 µl         | 20 µl                |
| <b>Master Mix</b>       | <b>10 µl</b> | <b>200 µl</b>        |

Legen Sie **10 µl Master Mix** in jedes Gefäß vor. Pipettieren Sie **10 µl** extrahierte **RNA**, hochreines Wasser (**NTC**) or SARS-CoV-2 **Pos. Control** dazu um das Endvolumen von 20 µl zu erreichen.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos pipettieren Sie die Proben in dieser Reihenfolge: Zuerst NTC, danach Ihre Proben, zuletzt die Positivkontrollen. Reaktionsgefäße sofort verschließen.

» **Anmerkung:** Vermeiden Sie Luftblasen im PCR-Ansatz und Fingerabdrücke auf den optischen Oberflächen der Reaktionsgefäße. Beides kann die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. Wenn nötig kurz zentrifugieren. «

### 7.4. RT-PCR Programm

Programmieren Sie Ihr real-time PCR Gerät wie vom Hersteller angegeben für RT-PCR Experimente. Stellen Sie die PCR-Ansätze in den Thermocycler und starten Sie folgendes Programm:

| Zyklen | Temp | Zeit   | Schritt  |
|--------|------|--------|--|
| 1      | 50°C | 10 min | Reverse Transkription  |
| 1      | 95°C | 3 min  | Polymerase Aktivierung und RTase Inaktivierung                         |
| 45     | 95°C | 15 sec | Denaturierung  |
|        | 57°C | 30 sec | Annealing/Extension – <b>Datenaufnahme</b> im FAM-, HEX- und Cy5-Kanal |

## 8. Datenanalyse / Interpretation der Ergebnisse

Das Vorhandensein von SARS-CoV-2 Sequenzen in einer Probe wird durch Signale in Form sigmoidaler Kurven in den **FAM- und HEX-Kanälen** bestimmt. Das Vorhandensein von humaner RNA im Ausgangsmaterial wird durch ein im **Cy5-Kanal** angezeigtes sigmoidales Kurven-Signal bestimmt.

| Kontrollen / Proben     | Amplifikation pro Kanal |                           |                 | Interpretation                                      |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|---|
|                         | FAM<br>N Gen            | HEX<br>RdRP/ORF1ab<br>Gen | Cy5<br>ACTB Gen |   |
| No Template Control     | NEIN                    | NEIN                      | NEIN            | ---   |
| SARS-CoV-2 Pos. Control | JA                      | JA                        | JA              | ---   |
| Probe 1                 | JA                      | JA                        | JA/NEIN**       | Gesuchte SARS-CoV-2-Sequenzen sind <b>vorhanden</b> |
| Probe 2*                | JA                      | NEIN                      | JA/NEIN**       | Gesuchte SARS-CoV-2-Sequenz ist <b>vorhanden</b>    |
| Probe 3*                | NEIN                    | JA                        | JA/NEIN**       | Gesuchte SARS-CoV-2-Sequenz ist <b>vorhanden</b>    |
| Probe 4                 | NEIN                    | NEIN                      | JA              | Gesuchte SARS-CoV-2-Sequenzen <b>fehlen</b>         |
| Probe 6                 | NEIN                    | NEIN                      | NEIN            | Test wiederholen***                                 |

\* Ein Signal für nur eines der beiden SARS-CoV-2 spezifischen Ziele kann auf eine geringe Anzahl von Viruskopien nahe der Nachweisgrenze in der Probe oder auf Mutationen, die die Primer/Sonden-Bindungsstellen beeinflussen, zurückzuführen sein.

\*\* Das Signal für humanes ACTB ist nicht erforderlich, um das Vorhandensein einer SARS-CoV-2 Sequenz in der Probe nachzuweisen. Eine hohe virale RNA Konzentration kann das Signal für die Kontrollsequenz unterdrücken oder eliminieren.

\*\*\* Fehlerhafte RNA Extraktion und/oder RT-PCR.

Einige Auswertprogramme benötigen manuell gesetzte Grundlinie und Schwellenwerte (Threshold) zur korrekten Signalerkennung.

Empfehlungen zur **Einstellung der Grundlinie**: Setzen Sie den Beginn der Grundlinie bei Zyklus 3 bis 5, und das Ende bei jenem Zyklus, der unmittelbar vor dem ersten Anstieg der sigmoidalen Kurve liegt.

Empfehlungen zur **Einstellung des Schwellenwertes (Cq)**: Setzen Sie den Schwellenwert für den FAM-, HEX- und Cy5-Kanal etwas höher als die Hintergrundfluoreszenz der No Template Control (FAM-HEX-Cy5-negative Positionen)

Liegen Signale im Bereich der Nachweisgrenze (Cq 38.5 +/- 1.5), empfehlen wir eine Bestätigung durch erneutes Testen der Probe im Dreifachansatz. Proben, die den Schwellenwert nach Cq 40 übersteigen, gelten als nicht schlüssige Ergebnisse und sollen als negativ angesehen werden.

Folgen Sie der Anleitung Ihres real-time PCR Auswertprogrammes um die gewonnenen Daten zu analysieren.

## 9. Sicherheitshinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für den professionellen Gebrauch im Labor.
- Tragen Sie beim Hantieren der Proben und Reagenzien immer puderfreie Einweghandschuhe und geeignete Laborkleidung.
- Bereiten Sie den RT-PCR Ansatz in einem RNase-freien Bereich vor, der von der RNA Präparation und der Analyse getrennt ist.
- Benützen Sie ein eigenes Pipettenset nur für den PCR-Ansatz und verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolfilter.
- Benützen Sie ausschließlich dünnwandige, gerätekomppatible PCR-Gefäße mit für optische Messungen geeignetem Verschluss.
- Mischen Sie keine Reagenzien mit verschiedenen Lotnummern.
- Verwenden Sie keine abgelaufenen Kits oder Kit-Komponenten.