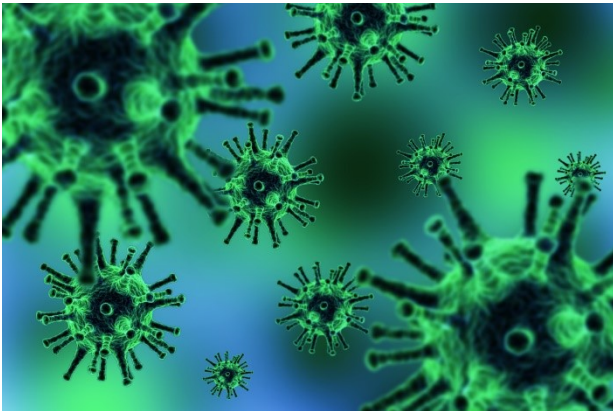


CONGEN

SureFast[®]
SARS-CoV-2 PLUS

Art. No. F7110
100 rxn

User Manual



January 2022

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	RNA Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	RNA-Präparation	5
2.1.2	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Validierung	6
4	Weitere Informationen	7
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
4.2	Technischer Support	7



Content

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Limit of Detection	8
1.3	RNA Preparation	8
1.4	Kit components and storage	8
1.5	Additionally required equipment and materials	9
1.6	Setup.....	9
1.7	Detection channel Set-up	9
2	Qualitative Analysis	10
2.1	Protocol	10
2.1.1	RNA Preparation	10
2.1.2	Preparation of the master-mix	10
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix	11
2.2	Interpretation of results	11
3	Validation	11
4	Further Information	12
4.1	Product Information	12
4.2	Technical Support	12

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFast® SARS-CoV-2 PLUS ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis der neuartigen Coronavirus (SARS-CoV-2) RNA. Die SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR wurde in Kombination mit SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. Nr. F1051) von der AOAC (Lizenz-Nr. 022102) validiert und zertifiziert.

Die SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR ist nicht für die Anwendung als in-vitro Diagnostik und nicht als diagnostisches Verfahren nach Richtlinie 98/79/EG oder Verordnung (EU) 2017/746 zu verwenden. Der Test ist mit einer Internal Control RNA (ICR, bestehend aus MS2- Bakteriophagen) ausgestattet, die gleichzeitig als interne Amplifikationskontrolle und Extraktionskontrolle verwendet werden kann.

Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der RNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid).

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die interne Validierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

Die externe Validierung durch AOAC erfolgte am Bio-Rad CFX96.

Hinweis:

Ein negatives qPCR Ergebnis schließt nicht aus, dass eine SARS-CoV-2 Kontamination unterhalb der Nachweisgrenze des SureFast® SARS-CoV-2 PLUS Tests vorliegt.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 25 RNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, RNA-Präparation und RNA-Gehalt. Die SureFast® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-RNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-RNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-RNA erhalten.

1.3 RNA Präparation

Für die RNA-Präparation wird der SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. Nr. F1051) empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Gelb
2	Enzyme Mix	1 x 80 µl	Rot
R	Internal Control RNA	2 x 1800 µl	Braun
N	PCR Water	1 x 500 µl	Weiß
P	Positive Control	1 x 250 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- RNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP DNA/RNA Virus Art. Nr. F1051)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & Rotor-Gene & R-Biopharm RIDA®CYCLER	LightCycler® 480 II
Reverse Transcription	10 min, 58 °C	10 min, 58 °C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions -kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Agilent AriaMx	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Applied Biosystems 7500 Fast	SARS-CoV-2	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	ICR	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	green	+	
	ICR	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	ICR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	SARS-CoV-2	465-510	+	
	ICR	533-580	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wird der SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. Nr. F1051) empfohlen.

Dieser Test enthält eine Internal Control RNA (ICR), die entweder als interne Amplifikationskontrolle oder als positive Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die ICR als interne Amplifikationskontrolle verwendet, muss 1 µl pro Reaktion der ICR dem Master-Mix hinzugefügt werden (siehe Punkt 2.1.2).

Wird die ICR als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICR während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICR wird vor der Lyse zu der schon mit Lysis Buffer versetzten Probe gegeben und sollte nicht direkt auf das Probenmaterial pipettiert werden.

2.1.2 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, negative Extraktionskontrolle und Positivkontrolle. Dieser Test enthält eine interne Amplifikationskontrolle (ICR), die als positive Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen SARS-CoV-2 -Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-RNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:

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

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICR als interne Inhibitionskontrolle:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
ICR	1,0 µl	11,0 µl
Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Für die Negativkontrolle pipettieren von 5 µl des PCR Water in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-RNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter SARS-CoV-2 detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (ICR) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter SARS-CoV-2 bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen.

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

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter SARS-CoV-2 bewertet, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

Sollte die Proben-RNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-RNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der RNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die RNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für SARS-CoV-2 mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

3 Validierung

Die externe Validierung der SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR in Kombination mit SureFast® PREP DNA/RNA Virus erfolgte nach den AOAC Performance Tested Methods (PTM).

Die Ergebnisse der Validierungsstudie zeigten, dass SureFast® SARS-CoV-2 PLUS Testmethode vergleichbar ist zu der CDC (Center for Disease Control and Prevention) 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Methode. Die SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR wurde für Abstriche von Edeltahloberflächen validiert.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage
- Zertifikat AOAC (Lizenz-Nr. 022102)

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de

1 General Information

1.1 Description

The SureFast® SARS-CoV-2 PLUS is a real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) RNA. The SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR in combination with the SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. No. F1051) has been validated and certified by AOAC (license-no. 022102).

Do not use for in-vitro diagnostics. Also do not use diagnostic procedures according to directive 98/79/EC or regulation (EU) 2017/746.

Each reaction contains an Internal Control RNA (ICR, consisting of MS2-bacteriophage) as an internal control of sample preparation procedure and to monitor possible PCR-inhibition. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride).

The real-time RT-PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500 Fast Dx, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

The external validation according to AOAC was performed on the Bio-Rad CFX96.

Note:

Samples tested negative with SureFast®SARS-CoV-2 PLUS still could contain a SARS-CoV-2 contamination below the limit of detection of the assay.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR has a limit of detection of ≤ 25 RNA copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, RNA preparation and RNA content. The SureFast® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target RNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total RNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target RNA.

1.3 RNA Preparation

For RNA-preparation the use of SureFast® PREP DNA/RNA Virus (Art. No. F1051) is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Enzyme Mix	1 x 80 µl	Red
R	Internal Control RNA	2 x 1800 µl	Brown
N	PCR Water	1 x 500 µl	White
P	Positive Control	1 x 250 µl	Light Blue

Store all reagents at –20°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- RNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP DNA/RNA Virus Art. No. F1051)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	Blockcycler & Rotor-Gene & R-Biopharm RIDA®CYCLER	LightCycler® 480 II
Reverse Transcription	10 min, 58 °C	10 min, 58 °C
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Agilent AriaMx	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	HEX	+	
Applied Biosystems 7500 Fast	SARS-CoV-2	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	ICR	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	SARS-CoV-2	FAM	+	
	ICR	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	SARS-CoV-2	green	+	
	ICR	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	SARS-CoV-2	green	+	Note: Please use only 0.1 mL reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	SARS-CoV-2	465-510	+	
	ICR	533-580	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 RNA Preparation

For RNA-preparation the use of SureFast[®] PREP DNA/RNA Virus (Art. No. F1051) is recommended.

The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control for the sample preparation procedure and as a PCR inhibition control.

If the ICR is used only as a PCR inhibition control, 1 µl per reaction of the ICR should be added to the master-mix (see point 2.1.2).

If the ICR is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the ICR should be added during extraction procedure. The ICR should always be pipetted to the sample with added Lysis Buffer and must not be added directly to the raw sample.

2.1.2 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, negative extraction control, positive control. The test assay contains an Internal Control RNA (ICR), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control.

Reactions needed for the qualitative SARS-CoV-2 detection:

3 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control, 1x positive control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample RNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20.0 µl	220.0 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions for ICR only as PCR inhibition control:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
ICR	1.0 µl	11.0 µl
Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	21.0 µl	231.0 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Negative control: pipette 5 µl of PCR Water into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of sample RNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

SARS-CoV-2 RNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the internal amplification or positive extraction control (ICR) is detected. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **positive** for SARS-CoV-2, if the sample RNA shows amplification in the FAM-channel.

A sample is stated **negative** for SARS-CoV-2, if the sample RNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal amplification or positive extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-Value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample RNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances RNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the RNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific SARS-CoV-2 PCR assay.

3 Validation

The external validation of the SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR in combination with the SureFast® PREP DNA/RNA Virus was performed by the AOAC Performance Tested Methods (PTM) Program.

The results of the validation study demonstrated the SureFast® SARS-CoV-2 PLUS test method is comparable to the CDC (Center for Disease Control and Prevention) 2019-Novel Coronavirus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel method. The SureFast® SARS-CoV-2 PLUS real-time RT-PCR was approved for stainless steel environmental surface swabs.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request
- AOAC certificate (license no. 022102)

4.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.