Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit K1180A

Gebrauchsanweisung

Zur In-vitro-Diagnostik

Nur zum Export. Nicht zum Vertrieb in den Vereinigten Staaten.

Version B1, Februar 2022

Symboltabelle

CE	Europäische Konformität		Vorsicht
IVD	In-vitro-Diagnostikum	REF	Katalog-/Codenummer
	Hersteller		Gebrauchsanweisung beachten
	Haltbarkeitsdatum		Enthält Material für <N> Tests
LOT	Chargenbezeichnung		Nicht wiederverwenden
	Zulässiger Temperaturbereich	UDI	Eindeutige Gerätekennung
EC REP	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft		

Hinweis für den Käufer: Beschränktes Nutzungsrecht

Dieses Produkt wird im Rahmen der Lizenzvereinbarungen zwischen Agilent und Life Technologies Corporation verkauft. Der Kaufpreis dieses Produkts beinhaltet das eingeschränkte, nicht übertragbare Recht der Life Technologies Corporation, nur diese Menge des Produkts zur Anwendung bei *In-vitro*-Tests von SARS-CoV-2 bei Menschen gemäß der diesem Produkt beiliegenden Gebrauchsanweisung zu verwenden. Es werden keine weiteren Rechte übertragen. Weitere Informationen zum Erwerb von Lizenzen unter dem oben genannten Patent erhalten Sie von der Lizenzierungsabteilung, Life Technologies Corporation, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. E-Mail: **outlicensing@lifetech.com**.

1 Produktinformationen zum Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Verwendungszweck 6

Produktbeschreibung 7

- Produktübersicht/Testprinzip 7
- Beschreibung der Testschritte 7
- Kontrollmaterialien zur Verwendung mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit 7

Assay-Workflow 9

2 Materialien, Sicherheit und Handhabung

Mitgelieferte Materialien 11

Reagenzien, Materialien, Ausrüstung und Software, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden 12

Sicherheitshinweise 15

Lagerung und Handhabung 17

- Produktverpackung 17
- Lagerung, Handhabung und Stabilität von Reagenzien 17
- Entnahme, Handhabung und Lagerung von Proben 17

3 Anweisungen zur Extraktion von Nukleinsäuren

Extraktion von Nukleinsäuren 19

4 Anweisungen zur Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen

Einrichten des qRT-PCR-Experiments auf dem Echtzeit-PCR-System 21

- Erstellen und Einrichten des AriaMx/AriaDx-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde) 22
- Erstellen des AriaMx/AriaDx-Experiments aus der gespeicherten Vorlage 27
- Erstellen und Einrichten des ABI 7500 Fast-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde) 28
- Erstellen des ABI 7500 Fast-Experiments aus der gespeicherten Vorlage 34
- Erstellen und Einrichten des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments (erforderlich, wenn noch keine gespeicherten Protokoll- und Plattendateien erstellt wurden) 35
- Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien 41

Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen 42

5 Anweisungen zur Durchführung der qRT-PCR

Durchführen der qRT-PCR auf dem Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System 47

- Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem AriaMx/AriaDx-System 47
- Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das AriaMx/AriaDx-Experiment 48
- Exportieren der Daten aus der Aria-Software 53

Durchführen der qRT-PCR auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument 56

Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument 56
Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das ABI 7500 Fast-Experiment 56
Exportieren der Well-Tabellendaten aus der Design & Analysis-Software in eine CSV-Datei 61
Durchführen der qRT-PCR auf dem Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 63
Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 63
Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 63
Exportieren der Daten aus der CFX Maestro-Software 68

6 Analyse und Ergebnisse

Auswertung der Ergebnisse 71
Ergebnisse und Auswertung für Kontrollproben 71
Ergebnisse und Auswertung für klinische Proben 72

7 Qualitätskontrolle

Qualitätskontrolle 76

8 Beschränkungen des Assays

Beschränkungen 78

9 Leistungsmerkmale

Leistungsmerkmale 80
Analytische Empfindlichkeit (Nachweisgrenze) 80
Analytische Inklusivität 81
Kreuzreaktivität 81
Klinische Auswertung 81

10 Literaturhinweise

Produktetiketten 84

1 Produktinformationen zum Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

Verwendungszweck **6**
Produktbeschreibung **7**
Assay-Workflow **9**

Dieses Kapitel enthält Einführungsinformationen zum Assay.

Verwendungszweck

Das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ist ein Echtzeit-RT-PCR-In-vitro-Diagnosetest für den qualitativen Nachweis von RNA aus SARS-CoV-2, die aus nasopharyngealen (NP), nasalen und oropharyngealen (OP) Abstrichproben von Personen, die die klinischen und/oder epidemiologischen COVID-19-Kriterien erfüllen, isoliert und aufgereinigt wurden.*

Die Ergebnisse dienen zur Identifizierung von SARS-CoV-2-RNA. Die RNA von SARS-CoV-2 kann in der Regel während der akuten Infektionsphase in Proben aus den oberen Atemwegen nachgewiesen werden. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin. Eine klinische Korrelation mit der Krankengeschichte und anderen diagnostischen Informationen des Patienten ist notwendig, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Positive Ergebnisse schließen eine bakterielle Infektion oder eine Koinfektion mit anderen Viren nicht aus. Bei dem nachgewiesenen Erreger handelt es sich möglicherweise nicht um die eindeutige Krankheitsursache.

Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen bezüglich des Patientenmanagements dienen. Negative Ergebnisse müssen mit anderen klinischen Beobachtungen, der Krankengeschichte des Patienten und epidemiologischen Informationen kombiniert werden.

Das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ist für die Verwendung durch qualifiziertes und geschultes klinisches Laborpersonal vorgesehen, das speziell in die Bedienung des Agilent Systems und In-vitro-Diagnoseverfahren eingewiesen und darin geschult wurde.

* Die Leistung des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit-Assays wurde unter Verwendung von nasopharyngealen Abstrichproben ermittelt, die in UTM- oder VCM-Transportmedien gesammelt wurden. Oropharyngeale Abstriche, nasale Abstriche und nasale Abstriche aus der mittleren Nasenmuschel werden als zulässige Probenarten für die Verwendung mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit-Assay angesehen. Die Leistung wurde mit diesen Probenarten jedoch nicht nachgewiesen. Das Testen von oropharyngealen Abstrichen, nasalen Abstrichen und nasalen Abstrichen aus der mittleren Nasenmuschel (selbst entnommen unter Aufsicht eines Gesundheitsdienstleisters oder von diesem entnommen) ist auf Patienten mit COVID-19-Symptomen beschränkt.

Produktbeschreibung

Produktübersicht/Testprinzip

Das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit ist ein Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion-(qRT-PCR)-Test. Das SARS-CoV-2-Primer- und Sondenset ist für den Nachweis von RNA aus SARS-CoV-2 in nasopharyngealen (NP), nasalen und oropharyngealen (OP) Abstrichproben von Patienten bestimmt, bei denen der Gesundheitsdienstleister eine COVID-19-Erkrankung vermutet.

Beschreibung der Testschritte

Die Nukleinsäuren werden aus ~140–200 µl (je nach Extraktionsmethode) nasopharyngealen (NP) Abstrichproben mit einem automatisierten Extraktionssystem (Qiagen QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit mit QIAsymphony, ThermoFisher MagMAX Viral/Pathogen II Kit mit KingFisher Flex) isoliert und aufgereinigt. Die aufgereinigte Nukleinsäure (5 µl) wird in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer einstufigen qRT-PCR-Reaktion mit Agilent Brilliant III qRT-PCR-Reagenzien auf unterstützten Echtzeit-PCR-Geräten amplifiziert. Dabei bindet die Sonde an eine spezifische Zielsequenz, die sich zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer befindet. Während der Verlängerungsphase des PCR-Zyklus wird die Sonde durch die 5'-Nukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut, wodurch der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff getrennt und ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird. Mit jedem Zyklus werden zusätzliche Moleküle des Reporter-Farbstoffs von ihren jeweiligen Sonden abgespalten, wodurch sich die Fluoreszenzintensität erhöht. Die Fluoreszenzintensität wird bei jedem PCR-Zyklus mit unterstützten Echtzeit-PCR-Geräten (Agilent AriaMx/AriaDx, ABI 7500 Fast oder Bio-Rad CFX96) überwacht.

Kontrollmaterialien zur Verwendung mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit

- Eine Negativkontrolle ohne Vorlage wird benötigt, um das Assay-Verfahren auf Kontaminationen zu überprüfen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Diese muss mindestens einmal pro PCR-Platte verwendet werden. Als Negativkontrolle fügt der Benutzer Wasser anstelle der extrahierten RNA hinzu.
- Eine positive Vorlagenkontrolle wird benötigt, um sicherzustellen, dass der Mechanismus zum Nachweis der gezielten SARS-CoV-2-RNA nicht beeinträchtigt wird. Diese muss mindestens einmal pro PCR-Platte verwendet werden (50 Kopien/Reaktion). Bei der im Kit enthaltenen Positivkontrolle handelt es sich um synthetische RNA, die den viralen Zielsequenzen entspricht.
- Eine Extraktionskontrolle (Humanprobenkontrolle oder HSC) wird benötigt, um sicherzustellen, dass die RNA in der Originalprobe während der Extraktion erhalten bleibt. Diese muss mindestens einmal pro Extraktionscharge verwendet werden.

- Eine interne Kontrolle (humanes RNase P-Gen) wird benötigt, um sicherzustellen, dass die RNA aus der Originalprobe in der qRT-PCR-Reaktion nachweisbar ist. Es wird von einem Nachweis sowohl in der HSC als auch in den meisten Humanproben mit ausreichend zellulärer RNA ausgegangen. In Humanproben kann die interne Kontrolle möglicherweise nicht nachgewiesen werden, wenn die RNA des SARS-CoV-2-Virus in hohen Konzentrationen vorliegt.

Mit dem Kit gelieferte Kontrollen

Tabelle 1 Mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit gelieferte Kontrolle

Art der Kontrolle	Name der Kontrolle	Name des Lieferanten	Teilenr. des Lieferanten
Positiv	Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx	Agilent	K1180-64200

Erforderliche, aber nicht mit dem Kit gelieferte Kontrollen

- Nucleasefreies Wasser in molekularbiologischer Qualität, zur Verwendung als Negativkontrolle ohne Vorlage
- Extraktionskontrolle: Dem Kunden stehen mehrere Optionen zur Verfügung, die auf CDC-Empfehlungen basieren
  - Human Specimen Control, hergestellt von der CDC, KT0189
  - Negatives Humanprobenmaterial: Labore können ein Volumen an Humanprobenmaterial (z. B. Humanseren oder gepoolte Reste von negativen Atemwegsproben) vorbereiten, um es zu extrahieren und zusammen mit klinischen Proben als Extraktionskontrolle zu verwenden. Dieses Material sollte in ausreichender Menge vorbereitet werden, um über mehrere Läufe hinweg verwendet werden zu können. Das Material sollte vor der Verwendung als Extraktionskontrolle getestet werden, um sicherzustellen, dass es die erwarteten Ergebnisse für das in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführte HSC erzeugt.
  - Künstliches Humanprobematerial: Labore können künstliche Humanprobenmaterialien herstellen, indem sie eine beliebige humane Zelllinie (z. B. A549, Hela oder 293) in PBS suspendieren. Dieses Material sollte in ausreichender Menge vorbereitet werden, um über mehrere Läufe hinweg verwendet werden zu können. Das Material sollte vor der Verwendung als Extraktionskontrolle getestet werden, um sicherzustellen, dass es die erwarteten Ergebnisse für das in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführte HSC erzeugt.

Assay-Workflow

Extrahieren Sie zu Beginn des Assays die Nukleinsäure aus den nasopharyngealen Testproben zusammen mit einer geeigneten Humanprobenkontrolle.

Führen Sie anschließend ein Multiplex-qRT-PCR-Experiment mit den extrahierten RNA-Proben und der bereitgestellten RNA-Positivkontrolle durch. Fügen Sie eine Kontrolle ohne Vorlage (NTC) hinzu.

Analysieren Sie nach Abschluss des qRT-PCR-Laufs die Daten für die Amplifikation der viralen Zielfragmente von N1 und N2 und des humanen RNase P-Genziels.

Melden Sie abschließend die Ergebnisse für die Testproben.

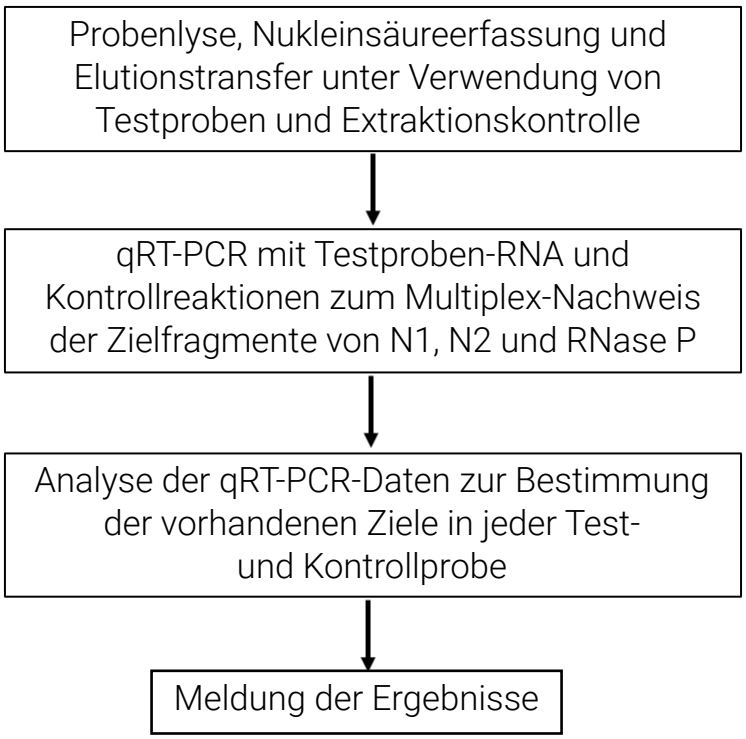


Abbildung 1 Workflow des SARS-CoV2 qRT-PCR Dx-Assays

2 Materialien, Sicherheit und Handhabung

Mitgelieferte Materialien **11**
Reagenzien, Materialien, Ausrüstung und Software, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden **12**
Sicherheitshinweise **15**
Lagerung und Handhabung **17**

Dieses Kapitel beschreibt die Reagenzien und anderen Materialien, die für den Assay verwendet werden, und stellt Informationen für die sichere Durchführung des Assays bereit.

Mitgelieferte Materialien

Tabelle 2 führt die mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit bereitgestellten Materialien und die erforderlichen Temperaturen auf. Siehe **„Lagerung und Handhabung“** auf Seite 17 bezüglich weiterer Anweisungen zur Aufbewahrung der Materialien.

Tabelle 2 Materialien, die mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit geliefert werden, Teilenr. K1180A

Materialien	Menge	Komponenten	Temperaturbereich für Lagerung
Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents, Teilenr. K1180-64100*	Ausreichend für 400 qRT-PCR-Reaktionen (Testproben und Kontrollen) *Beachten Sie, dass jede qRT-PCR-Reaktionsplatte mindestens 3 Wells für Kontrollreaktionen enthalten muss.*	2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	Nach Erhalt bei –20 °C lagern.
		RT/RNase Block Dx	Nach Erhalt bei –20 °C lagern.
		Reference Dye Dx†	Nach Erhalt bei –20 °C lagern.
		100 mM DTT Dx	Nach Erhalt bei –20 °C lagern.
		10× SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx†	Nach Erhalt bei –20 °C lagern.
Agilent SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx, Teilenr. K1180-64200‡	Ausreichend für 8 Assays	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Nach Erhalt bei –80 °C lagern.

* Das Kit mit SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Reagents ist auch separat bei Agilent unter der Teilenr. K1180B erhältlich.

† Dieses Reagenz ist lichtempfindlich und muss nach Möglichkeit vor Licht geschützt werden.

‡ SARS-CoV-2 Positive RNA Ctl Dx ist auch separat bei Agilent unter der Teilenr. K1180C erhältlich.

Reagenzien, Materialien, Ausrüstung und Software, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden

Tabelle 3 führt die Optionen für den RNA-Extraktionsschritt des Protokolls auf, der auf einem automatisierten Gerät durchgeführt wird. Das Verfahren zur RNA-Extraktion ist unter **„Anweisungen zur Extraktion von Nukleinsäuren“** auf Seite 18 beschrieben.

Tabelle 3 RNA-Extraktionsoptionen – erforderlich, aber nicht bereitgestellt

RNA-Extraktionskit	Gerät
QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, Teilenr. 937055	QIAGEN QIAsymphony SP, Teilenr. 9001297 (Automatisierung)
Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher-Teilenr. A48383	Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex Purification System, Teilenr. 5400630 (Automatisierung)

Tabelle 4 führt die Optionen für die Humanprobenkontrolle auf. Bei dieser Kontrollprobe handelt es sich um ein humanes Zellkulturpräparat, das als Kontrolle für das Extraktionsverfahren verwendet wird, um die erfolgreiche Rückgewinnung der Nukleinsäure sowie die Integrität des Extraktionsreagenzes nachzuweisen.

Tabelle 4 Optionen für die Humanprobenkontrolle – erforderlich, aber nicht bereitgestellt

Humanprobenkontrolle	Beschreibung
Human Specimen Control (HSC), 10 Fläschchen x 500 µl, CDC-Teilenr. KT0189	Hergestellt und vertrieben von der CDC. Die CDC-HSC besteht aus nicht-infektiösem (mit beta-Propiolacton behandeltem) humanem Zellkulturmaterial, das als Flüssigkeit, suspendiert in 0,01 M PBS bei pH 7,2–7,4, geliefert wird.
Negatives Humanprobenmaterial	Wird vom Labor vorbereitet. Dabei handelt es sich um ein Volumen an Humanprobenmaterial (z. B. Humanseren oder gepoolte Reste negativer Atemwegsproben), das extrahiert und zusammen mit klinischen Proben als Extraktionskontrolle verwendet wird. Dieses Material sollte in ausreichender Menge vorbereitet werden, um über mehrere Läufe hinweg verwendet werden zu können. Das Material sollte vor der Verwendung als Extraktionskontrolle getestet werden, um sicherzustellen, dass es die erwarteten Ergebnisse für das in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführte HSC erzeugt.
Künstliches Humanprobematerial	Wird vom Labor vorbereitet. Bei dieser Art von Humanprobenkontrolle handelt es sich um künstliche Humanprobenmaterialien, die durch Suspendieren einer beliebigen humanen Zelllinie (z. B. A549, Hela oder 293) in PBS hergestellt werden. Dieses Material sollte in ausreichender Menge vorbereitet werden, um über mehrere Läufe hinweg verwendet werden zu können. Das Material sollte vor der Verwendung als Extraktionskontrolle getestet werden, um sicherzustellen, dass es die erwarteten Ergebnisse für die in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführte Humanprobenkontrolle erzeugt.

Tabelle 5 und **Tabelle 6** enthalten eine Auflistung der Reagenzien, Materialien, Ausrüstung und Geräte, die erforderlich sind, aber nicht mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit geliefert werden.

Tabelle 5 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

Reagenz oder Material	Form
Nucleasefreies Wasser in molekularbiologischer Qualität	Reagenz
10%ige Bleichlösung (1:10-Verdünnung einer 5,25%igen bis 6%igen Hypochloritbleiche)	Material
DNA*Zap*, Ambion-Teilenr. AM9890, oder gleichwertiges Dekontaminationsmittel	Material
RNase AWAY, Fisher Scientific-Teilenr. 21-236-21, oder gleichwertiges Dekontaminationsmittel	Material
Puderfreie Einweghandschuhe und OP-Kittel	Material
Sterile, nucleasefreie Aerosol-Barriere-Pipettenspitzen	Material
Nucleasefreie 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen	Material
Nucleasefreie 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen	Material
Nucleasefreie 96-Well-Platten, 200-µl *Verwenden Sie Platten, die mit dem gewählten Echtzeit-PCR-System kompatibel sind*	Material
Nucleasefreie 8-x-Röhrchenstreifen	Material
Nucleasefreie Plattenklebestreifen *oder* nucleasefreie optische 8-x-Kappenstreifen für 96-Well-PCR-Platten *Verwenden Sie Versiegelungen oder Streifen, die mit dem gewählten Echtzeit-PCR-System kompatibel sind*	Material
MicroAmp Optical Film Compression Pads, Thermo Fisher Scientific, Teilenr. 4312639*	Material

* Die Kompressionspads werden nur bei Verwendung von Klebestreifen zum Verschließen von Platten für das Echtzeit-PCR-System AriaMx/AriaDx benötigt

Tabelle 6 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Geräte, Software und Ausrüstung

Gerät, Software oder Ausrüstung	Form
Echtzeit-PCR-System • Agilent AriaMx Real-Time PCR System (Teilenr. G8830A) oder AriaDx Real-Time PCR System (Teilenr. K8930AA) **Software**: Aria Softwareversion 1.71 oder 1.8 und Electronic Tracking Software (im Lieferumfang von Teilenr. K8930AA enthalten oder separat erhältlich unter der Teilenr. G5380AA) • ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument mit Laptop (Teilenr. 4351106) oder Desktop-Computer (Teilenr. 4351107) **Software**: 7500 Softwareversion 2.3 und Design & Analysis Softwareversion 2.4.3 • Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Teilenr. 1855195) oder CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System mit Starter Package (Teilenr. 1855196) **Software**: CFX Maestro Software 2.0 Version 4.1.2 (im Lieferumfang von Teilenr. 1855196 enthalten oder separat erhältlich unter der Teilenr. 12004110)	Gerät mit Computer und Software
Software zum Anzeigen der aus der Echtzeit-PCR-Software exportierten Daten, z. B. Microsoft Excel	Software

Tabelle 6 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Geräte, Software und Ausrüstung (continued)

Gerät, Software oder Ausrüstung	Form
Vortex-Mischer	Ausrüstung
Mikrozentrifuge	Ausrüstung
Plattenzentrifuge für 96-Well-Platten	Ausrüstung
Mikropipetten P10, P20, P200 und P1000	Ausrüstung
Mehrkanalpipetten (5–50 µl)	Ausrüstung
Racks für Mikrozentrifugenröhrchen	Ausrüstung
Zwei (2) 96-Well-Kühl-Racks	Ausrüstung
Eiskübel	Ausrüstung

Sicherheitshinweise

1. Der Workflow des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits sollte von qualifiziertem und geschultem Personal durchgeführt werden, um das Risiko von fehlerhaften Ergebnissen zu vermeiden. Verwenden Sie getrennte Bereiche für die Vorbereitung von Patientenproben und Kontrollen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.
2. Dieser Test ist nur für den Nachweis von Nukleinsäure von SARS-CoV-2 zugelassen und nicht für andere Viren oder Erreger geeignet.
3. Lesen Sie die gesamte Gebrauchsanweisung sorgfältig durch.
4. Die Handhabung von Proben und Kontrollen sollte stets so erfolgen, als ob diese potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich sind, sowie in Übereinstimmung mit sicheren Laborverfahren. Siehe „Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with 2019-nCoV“. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html
5. Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung von Proben. Tragen Sie persönliche Schutzausrüstung (PSA), die den aktuellen Richtlinien zur Handhabung von potenziell infektiösen Proben entspricht. Desinfizieren Sie Flächen bei Verschüttungen umgehend.
6. Die Proben sind potenziell infektiös. Wenden Sie bei der Durchführung dieses Assays die allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen an. Die ordnungsgemäßen Handhabungs- und Entsorgungsmethoden sollten vom Laborleiter festgelegt werden. Nur Personal, das im Umgang mit infektiösem Material ausreichend geschult ist, darf dieses Diagnoseverfahren durchführen.
7. Wenn ein Verdacht auf eine Infektion mit 2019-nCoV auf der Grundlage der aktuellen, von der Gesundheitsbehörde empfohlenen, klinischen Screening-Kriterien besteht, sollten die Proben unter Beachtung angemessener Vorsichtsmaßnahmen zur Infektionskontrolle entnommen werden.
8. Verwenden Sie nur die bereitgestellten oder spezifizierten Einweg-Laborgeräte.
9. Verwenden Sie stets Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren. Die verwendeten Spitzen müssen steril sowie frei von DNasen und RNasen sein.
10. PCR-basierte Assays sind empfindlich gegenüber der versehentlichen Einführung von Amplifikationsprodukten aus früheren PCR-Reaktionen. Jede Kontamination der Testproben oder Reagenzien kann zu einem falschen Ergebnis führen. Der Labor-Workflow muss unidirektional ablaufen. Wenden Sie die folgenden bewährten Verfahren an, um eine Kontamination der Proben mit PCR-Produkten während des gesamten Workflows zu verhindern:
    - Weisen Sie separate Prä-PCR- und Post-PCR-Arbeitsstationen zu und verwenden Sie in jedem Bereich dedizierte Materialien und Reagenzien. Verwenden Sie insbesondere niemals Materialien, die für Post-PCR-Arbeiten vorgesehen sind, für Prä-PCR-Schritte des Workflows. Verwenden Sie zum Pipettieren von dedizierten Prä-PCR-Lösungen immer dedizierte Prä-PCR-Pipetten mit nucleasefreien, aerosolresistenten Spitzen.
    - Halten Sie die Arbeitsbereiche sauber. Reinigen Sie die Oberflächen des Prä-PCR-Bereichs täglich und zwischen den einzelnen Assays mit einer 10%igen Bleichlösung und/oder einem Produkt wie DNA*Zap* oder RNase AWAY. Entfernen Sie Rückstände von Bleiche mit 70%igem Ethanol.

- Tragen Sie einen sauberen Laborkittel und saubere, puderfreie Handschuhe. Wenden Sie eine gute Laborhygiene an, einschließlich des Wechselns von Handschuhen nach Kontakt mit potenziell kontaminierten Oberflächen.
- Wechseln Sie die Aerosollbarriere-Pipettenspitzen zwischen allen manuellen Flüssigkeitstransfers.
- Wenden Sie bei der Extraktion von Nukleinsäure aus Proben eine ordnungsgemäße aseptische Technik an, um das Risiko einer Kreuzkontamination zwischen Proben zu minimieren und die versehentliche Kontamination der Proben mit Nukleasen zu vermeiden.
- Halten Sie die Reagenz- und Reaktionsgefäße nach Möglichkeit verschlossen oder abgedeckt.

11 In den Arbeitsbereichen nicht essen, trinken, rauchen oder kosmetische Produkte auftragen.

12 Änderungen an den Assay-Reagenzien, dem Assay-Protokoll oder den Geräten sind nicht zulässig.

13 Die Reagenzien müssen gemäß den Angaben in **Tabelle 2** auf Seite 11 und in **„Lagerung und Handhabung“** auf Seite 17 gelagert und gehandhabt werden.

14 Verwenden Sie das Kit nicht nach dem angegebenen Verfallsdatum.

15 Entsorgen Sie Abfall in Übereinstimmung mit den Vorschriften von Gemeinden, Ländern und Bund.

16 Sicherheitsdatenblätter finden Sie unter www.agilent.com.

17 Verwenden Sie am Echtzeit-PCR-Gerät kein Material, das Guanidiniumthiocyanat oder andere Guanidin-haltige Materialien enthalten könnte. In Verbindung mit Natriumhypochlorit (Bleichmittel) können sich hochreaktive und/oder giftige Verbindungen bilden.

18 Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-RNA hin.

Lagerung und Handhabung

Produktverpackung

Prüfen Sie beim Empfang des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits sorgfältig die Produktverpackung auf sichtbare Anzeichen von Beschädigung. Wenn Sie eine Beschädigung der Produktverpackung feststellen, wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Agilent.

Lagerung, Handhabung und Stabilität von Reagenzien

- Prüfen Sie vor der Verwendung stets das Verfallsdatum. Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
- Schützen Sie die fluorogenen Sonden vor Licht.
- Primer, Sonden (einschließlich Aliquote) und Enzym-Mastermix müssen während der Vorbereitung und Verwendung stets aufgetaut und auf Eis oder einem Kühl-Rack gelagert werden.
- Die Kontrollen müssen während der Vorbereitung und Verwendung stets aufgetaut und auf Eis oder einem Kühl-Rack gelagert werden.
- Siehe **Tabelle 2** auf Seite 11 für die Temperaturbereiche für die Lagerung der Reagenzien des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits.

Entnahme, Handhabung und Lagerung von Proben

Die unzureichende oder ungeeignete Entnahme sowie Lagerung und der unzureichende oder ungeeignete Transport von Proben führen mit höherer Wahrscheinlichkeit zu falschen Testergebnissen. Aufgrund der Bedeutung der Probenqualität wird eine Schulung zur Probenentnahme dringend empfohlen. CLSI MM13-A kann als geeignete Ressource einbezogen werden.

- Entnahme der Probe
  - Siehe „Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (PUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV)“ unter https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html.
  - Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers des Probenentnahmegeräts für die geeignete Entnahmemethode.
- Transport von Proben
  - Klinisches Material, das dem Patienten entnommen wurde, sollte in einem geeigneten Transportsystem gelagert werden. Für das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit umfasst dies NP-Proben in Virustransportmedium (VTM), Universaltransportmedium (UTM), Kochsalzlösung, Liquid Amies oder Probentransportmedium (STM).

3 Anweisungen zur Extraktion von Nukleinsäuren

Extraktion von Nukleinsäuren **19**

Dieses Kapitel enthält Anweisungen zur Extraktion von RNA aus klinischen Testproben und der Humanprobenkontrolle.

Extraktion von Nukleinsäuren

Die Leistung des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits ist abhängig von der Menge und Qualität der aus Humanproben aufgereinigten Vorlagen-RNA. Die folgenden, handelsüblichen RNA-Extraktionskits und -Verfahren wurden hinsichtlich der RNA-Rückgewinnung und -Reinheit zur Verwendung mit dem Kit qualifiziert und validiert.

Für die Probenentnahme sind die vom Hersteller empfohlenen Verfahren zu befolgen (außer wie in den Empfehlungen unten angegeben). Die Humanprobenkontrolle muss in jeder Extraktionscharge enthalten sein.

QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit, Automatisierungsprotokoll

Empfehlung: 140 µl Probe verwenden und mit 60 µl Puffer eluieren.

MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, Automatisierungsprotokoll

Empfehlung: 200 µl Probe verwenden und mit 50 µl Puffer eluieren.

4 Anweisungen zur Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen

Einrichten des qRT-PCR-Experiments auf dem Echtzeit-PCR-System **21**
Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen **42**

Dieses Kapitel enthält Anweisungen zur Vorbereitung der Reaktionen der quantitativen Reverse-Transkription-PCR (qRT-PCR) für Testproben und Kontrollproben.

Einrichten des qRT-PCR-Experiments auf dem Echtzeit-PCR-System

Richten Sie vor der Einrichtung der qRT-PCR-Reaktionsplatte das Experiment im Echtzeit-PCR-System ein, damit das Gerät betriebsbereit ist, sobald die Reaktionsplatte vorbereitet ist.

Befolgen Sie die Anweisungen für Ihr spezifisches Echtzeit-PCR-System.

Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

- Siehe **„Erstellen und Einrichten des AriaMx/AriaDx-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)“** auf Seite 22, wenn Sie nicht über eine Vorlagendatei mit den erforderlichen Einstellungen verfügen.
- Wenn Sie über eine Vorlagendatei verfügen und diese verwenden möchten, siehe **„Erstellen des AriaMx/AriaDx-Experiments aus der gespeicherten Vorlage“** auf Seite 27.

HINWEIS

Schalten Sie das AriaMx- oder AriaDx-Gerät mindestens 3 Stunden vor der Verwendung ein. Das Gerät kann jederzeit eingeschaltet bleiben, um sicherzustellen, dass es stets einsatzbereit ist.

Laut Gerätespezifikation gelten folgende Betriebsbedingungen: 20–30 °C, 20–80 % Luftfeuchtigkeit und ≤ 2000 Meter Höhe.

ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

- Siehe **„Erstellen und Einrichten des ABI 7500 Fast-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)“** auf Seite 28, wenn Sie nicht über eine Vorlagendatei mit den erforderlichen Einstellungen verfügen.
- Wenn Sie über eine Vorlagendatei verfügen und diese verwenden möchten, siehe **„Erstellen des ABI 7500 Fast-Experiments aus der gespeicherten Vorlage“** auf Seite 34.

Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

- Siehe **„Erstellen und Einrichten des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments (erforderlich, wenn noch keine gespeicherten Protokoll- und Plattendateien erstellt wurden)“** auf Seite 35, wenn Sie nicht über gespeicherte Protokoll- und Plattendateien mit den erforderlichen Einstellungen verfügen.
- Wenn Sie über gespeicherte Protokoll- und Plattendateien verfügen, siehe **„Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien“** auf Seite 41.

Erstellen und Einrichten des AriaMx/AriaDx-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)

Wenn bereits eine Vorlage für das Experiment existiert, fahren Sie mit **„Erstellen des AriaMx/AriaDx-Experiments aus der gespeicherten Vorlage“** auf Seite 27 fort.

Schritt 1. Erstellen des Experiments

1 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Aria-Softwareanwendung und rufen Sie den Bildschirm „Getting Started“ (Erste Schritte) auf.

2 Klicken Sie unter **New Experiment** (Neues Experiment) auf **Experiment Types** (Experimenttypen) (falls nicht bereits ausgewählt).

3 Wählen Sie in der Mitte des Bildschirms **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** (Quantitative PCR, Fluoreszenzsonde) aus, wie in **Abbildung 2** gezeigt.

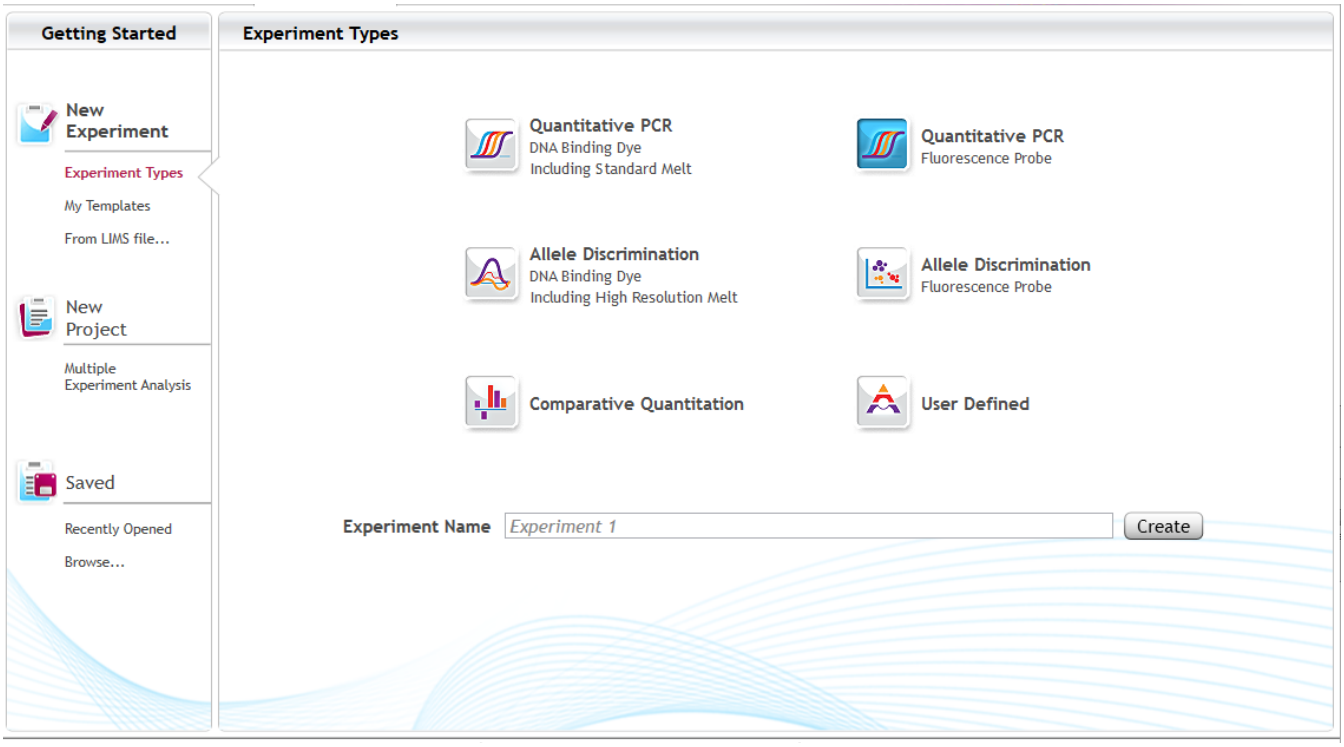


Abbildung 2 Aria-Bildschirm „Getting Started“ (Erste Schritte) – nach Auswahl von **Quantitative PCR, Fluorescence Probe** (Quantitative PCR, Fluoreszenzsonde)

4 Geben Sie einen Namen für das Experiment in das Feld „Experiment Name“ (Experimentname) ein und klicken Sie auf **Create** (Erstellen).

Das neue Experiment wird auf dem Bildschirm „Plate Setup“ (Platteneinrichtung) geöffnet. Standardmäßig sind alle Wells auf der Plattenkarte ausgewählt.

Die Auswahl aller 96 Wells ist sinnvoll, wenn in allen Wells der Platte eine qRT-PCR-Reaktion durchgeführt werden soll. Wenn eins der Platten-Wells leer bleibt, heben Sie die Auswahl dieser Wells in diesem Schritt auf.

Schritt 2. Zuweisen der Well-Typen und Well-Namen

5 Erweitern Sie im Bereich „Properties“ (Eigenschaften) auf der rechten Seite des Bildschirms die Dropdown-Liste **Well type** (Well-Typ) und wählen Sie **Unknown** (Unbekannt) aus.

Alle Wells auf der Plattenkarte werden als „Unknown“ (Unbekannt) gekennzeichnet.

6 Weisen Sie das Well A12 als Kontrolle ohne Vorlage (NTC) zu.

a Klicken Sie auf der Plattenkarte auf das Well A12, um dieses einzelne Well auszuwählen.

b Erweitern Sie im Bereich „Properties“ (Eigenschaften) auf der rechten Seite des Bildschirms die Dropdown-Liste **Well type** (Well-Typ) und wählen Sie **NTC** (NTC) aus.

Das Well A12 wird auf der Plattenkarte als „NTC“ (NTC) gekennzeichnet, während alle anderen Wells dem Typ „Unknown“ (Unbekannt) zugewiesen bleiben.

7 Wählen Sie auf der Plattenkarte erneut alle Wells aus.

Wenn Sie auf das Kontrollkästchen in der linken oberen Ecke der Plattenkarte klicken, werden alle Wells ausgewählt.

Die Platteneinrichtung wird nun wie in **Abbildung 3** angezeigt.

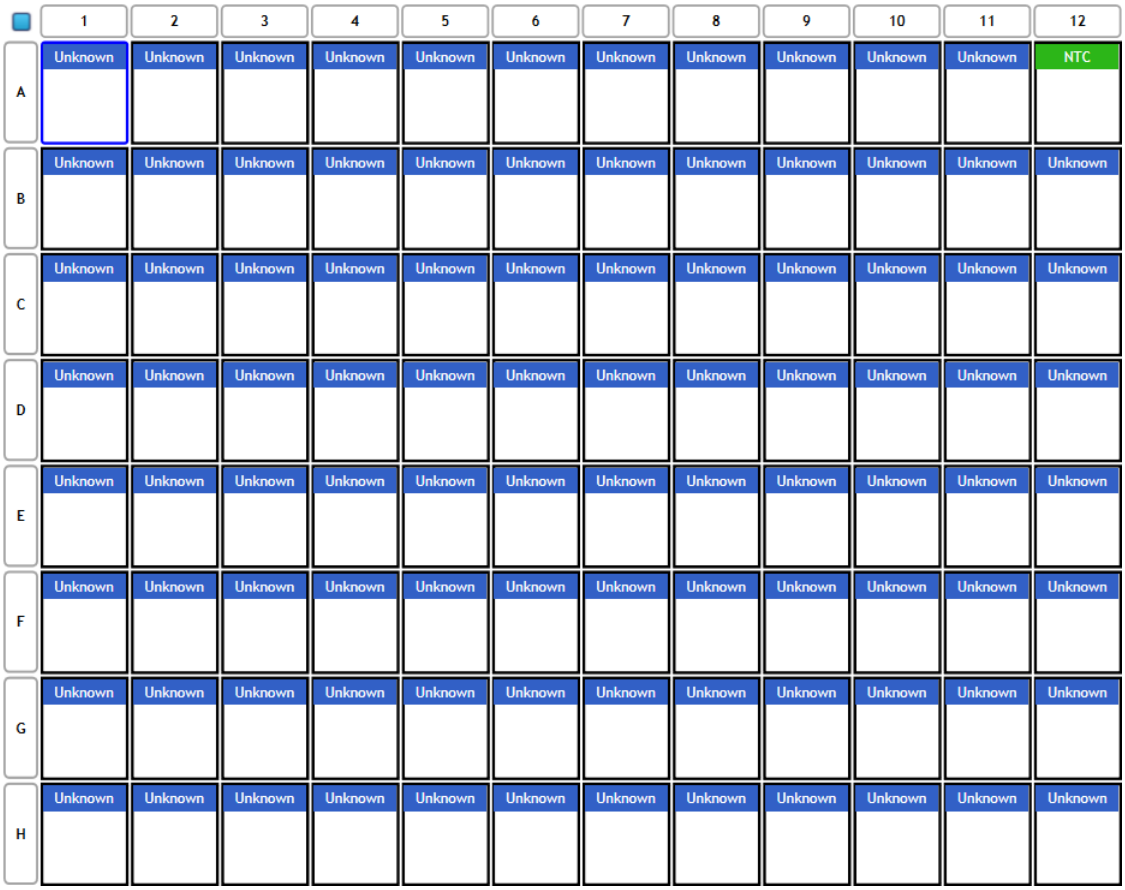


Abbildung 3 Zuweisungen der Well-Typen auf dem Aria-Bildschirm „Plate Setup“ (Platteneinrichtung)

8 Weisen Sie den Kontroll-Wells und, falls gewünscht, den Wells für die Testproben Well-Namen zu. Die Well-Namen, die den Kontroll-Wells zuzuweisen sind, sind in **Tabelle 7** aufgeführt. Sie können die Well-Namen manuell zuweisen oder eine Excel-Tabelle oder eine durch

Trennzeichen getrennte Textdatei importieren, in der die Well-IDs neben den zuzuweisenden Well-Namen aufgeführt sind.

- Um Well-Namen manuell zuzuweisen, ändern Sie die Einstellung „Show“ (Anzeigen) von **Type** (Typ) auf **Name** (Name). Wählen Sie die Wells auf der Platte aus und geben Sie dann den Namen für die ausgewählten Wells in das Feld „Well Name“ (Well-Name) ein.
- Um Well-Namen aus einer Excel- oder Textdatei zuzuweisen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Plattenkarte und wählen Sie **Import Well Name** (Well-Namen importieren) aus. Wählen Sie in dem sich öffnenden Dialogfeld die Excel- oder Textdatei aus. Informieren Sie sich im Aria-Hilfesystem über die erforderliche Dateiformatierung.

Tabelle 7 Zuweisungen der Well-Namen für Kontroll-Wells

Well-ID	Well-Name
A12	NTC
B12	HSC*
H12	Pos

* Wenn Sie mehr als eine Humanprobenkontrolle auf der Platte verwenden, nutzen Sie für diese Reaktionen die zusätzlichen Wells in Spalte 12 und benennen Sie die Wells entsprechend (z. B. HSC1, HSC2 usw.).

Schritt 3. Zuweisen von Farbstoffen und Zielen

9 Markieren Sie im Bereich „Properties“ (Eigenschaften) unter **Add Dyes** (Farbstoffe hinzufügen) die Kontrollkästchen für „FAM“ (FAM), „HEX“ (HEX) und „Cy5“ (Cy5).

In allen Wells auf der Plattenkarte werden farbcodierte Punkte für jeden der markierten Farbstoffe angezeigt.

10 Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Reference Dye“ (Referenzfarbstoff) die Option **ROX** (ROX) aus.

In allen Wells auf der Plattenkarte wird ein farbcodierter Punkt mit der Bezeichnung „R“ (R) angezeigt.

11 Klicken Sie auf die Pfeilspitze ▶ neben **Targets** (Ziele).

12 Geben Sie in den eingeblendeten Feldern „Target Name“ (Zielname) die Zielnamen gemäß **Abbildung 4** ein.

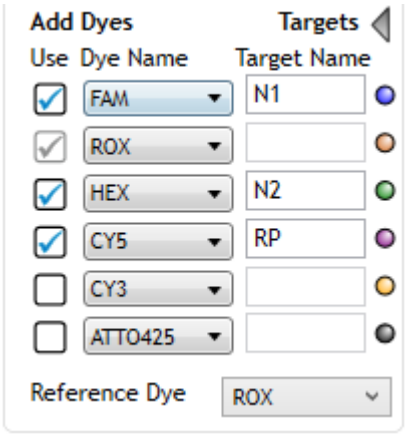


Abbildung 4 Zuweisungen der Farbstoffe und Ziele auf dem Aria-Bildschirm „Plate Setup“ (Platteneinrichtung)

Schritt 4. Einrichten des Temperaturprofils

13 Klicken Sie auf der linken Seite des Bildschirms unter **Set Up** (Einrichtung) auf **Thermal Profile** (Temperaturprofil).

Der Bildschirm „Thermal Profile“ (Temperaturprofil) wird geöffnet und zeigt das Standard-Temperaturprofil an.

14 Fügen Sie ein RT-Segment zum Start des Zyklusprogramms hinzu.

a Bewegen Sie den Cursor auf der Anzeige über das Segment „Hot Start“ (Heißstart). Klicken Sie auf das Symbol + (wie in **Abbildung 5** dargestellt), das auf der linken Seite des Segments „Hot Start“ (Heißstart) angezeigt wird.

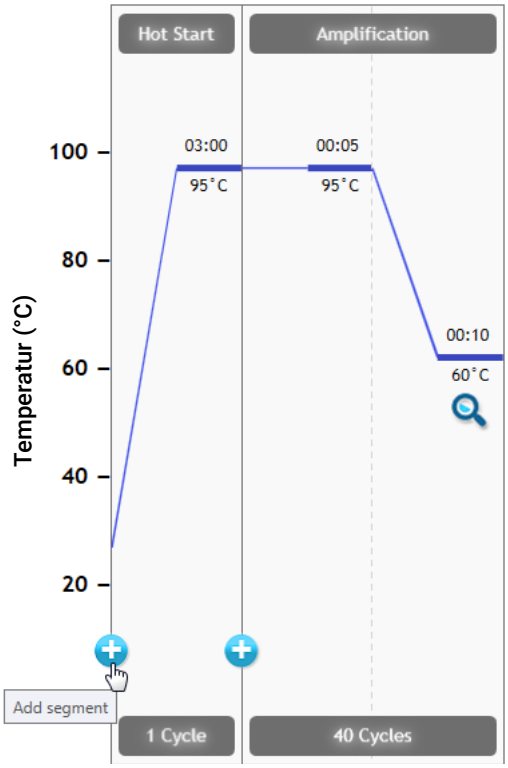


Abbildung 5 Hinzufügen eines neuen Segments auf dem Aria-Bildschirm „Thermal Profile“ (Temperaturprofil)

Das Programm öffnet einen Platzhalter für das neue Segment und listet die verfügbaren Segmenttypen auf.

b Klicken Sie im Platzhaltersegment auf **RT** (RT).

Das Temperaturprofil wird nun wie in **Abbildung 6** angezeigt.

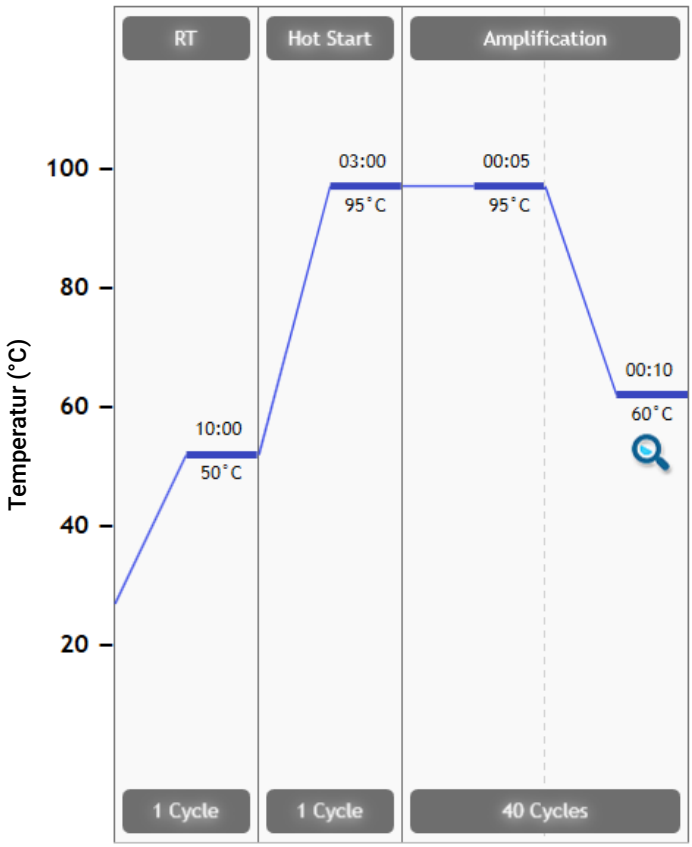


Abbildung 6 Temperaturprofil auf dem Aria-Bildschirm „Thermal Profile“ (Temperaturprofil)

15 Vergewissern Sie sich, dass das Temperaturprofil auf Ihrem Bildschirm mit dem in **Tabelle 8** gezeigten Temperaturzyklusprogramm übereinstimmt.

Tabelle 8 Temepraturzyklusprogramm für das AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

Segmentnummer	Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur
1	1	10 Minuten	50 °C
2	1	3 Minuten	95 °C
3	40	5 Sekunden	95 °C
		10 Sekunden	60 °C

Schritt 5. Speichern des Experiments als Vorlage

16 Klicken Sie auf **File** (Datei) **> Save As Template** (Als Vorlage speichern).

Das Dialogfeld „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet. Der Dateityp wird auf **AriaMx Template Files** (AriaMx-Vorlagendateien) (Dateierweiterung *amxt*) oder **AriaDx Template Files** (AriaDx-Vorlagendateien) (Dateierweiterung *adxt*) eingestellt.

17 Wählen Sie einen Ordner für die neue Vorlage aus.

18 Geben Sie in das Feld „File name“ (Dateiname) **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** ein.

19 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die neue Vorlagendatei in dem angegebenen Ordner.

Verwenden Sie für zukünftige Assays die gespeicherte Vorlage, um das qRT-PCR-Experiment zu erstellen und einzurichten, siehe **„Erstellen des AriaMx/AriaDx-Experiments aus der gespeicherten Vorlage."**

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen"** auf Seite 42 fort.

Erstellen des AriaMx/AriaDx-Experiments aus der gespeicherten Vorlage

Wenn keine Vorlage des Experiments mit der erforderlichen Platteneinrichtung und dem Temperaturprofil erstellt wurde, siehe **„Erstellen und Einrichten des AriaMx/AriaDx-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)"** auf Seite 22.

1 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Aria-Softwareanwendung und rufen Sie den Bildschirm „Getting Started" (Erste Schritte) auf.

2 Klicken Sie unter **New Experiment** (Neues Experiment) auf **My Templates** (Meine Vorlagen).

3 Geben Sie im Feld „Experiment Name" (Experimentname) einen Namen für das neue Experiment ein.

4 Wählen Sie die Vorlage **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** aus und erstellen Sie das Experiment.

- Wenn sich die Vorlage im Standardordner befindet, klicken Sie direkt auf die Vorlage, um sie auszuwählen, und klicken Sie dann auf **Create** (Erstellen) (oder doppelklicken Sie direkt auf die Vorlage). Das Programm erstellt das neue Experiment und öffnet das Experiment auf dem Bildschirm „Plate Setup" (Platteneinrichtung).
- Wenn sich die Vorlage nicht im aktuell ausgewählten Ordner befindet, klicken Sie auf das Symbol **Zur Vorlage navigieren** (siehe unten), um das Browserfenster zu öffnen. Navigieren Sie zu dem Ordner, der die Vorlagendatei **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** enthält. Wählen Sie die Datei aus, und klicken Sie auf **Open** (Öffnen). Das Programm erstellt das neue Experiment und öffnet das Experiment auf dem Bildschirm „Plate Setup" (Platteneinrichtung).

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen"** auf Seite 42 fort.

Erstellen und Einrichten des ABI 7500 Fast-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)

Wenn bereits eine Vorlage für das Experiment existiert, fahren Sie mit **„Erstellen des ABI 7500 Fast-Experiments aus der gespeicherten Vorlage“** auf Seite 34 fort.

Schritt 1. Erstellen des Experiments

1 Schalten Sie das ABI 7500 Fast-Gerät ein.

2 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Anwendung 7500 System Software.

3 Klicken Sie auf der Startseite unter **Set Up** (Einrichtung) auf **Advanced Setup** (Erweiterte Einrichtung).

Der Bildschirm „Experiment“ (Experiment) wird angezeigt.

4 Klicken Sie im Menü **Experiment** (Experiment) auf der linken Seite des Bildschirms unter **Setup** (Einrichtung) auf **Experiment Properties** (Experimenteigenschaften) (falls nicht bereits ausgewählt).

Die Einstellungen für „Experiment Properties“ (Experimenteigenschaften) werden in der Mitte des Bildschirms angezeigt.

5 Beantworten Sie die Fragen auf dem Bildschirm mithilfe der in **Tabelle 9** angezeigten Auswahlen und Eingaben.

Tabelle 9 Einstellungen unter „Experiment Properties“ (Experimenteigenschaften)

Frage	Auswahlen/Eingaben
„How do you want to identify this experiment?“ (Wie möchten Sie dieses Experiment identifizieren?)	• „Experiment Name“ (Experimentname): Geben Sie einen eindeutigen Namen für das Experiment ein. • „Barcode“ (Barcode): Leer lassen. • „User Name“ (Benutzername): Geben Sie Ihren Namen ein. • „Comments“ (Anmerkungen): Geben Sie die gewünschten Anmerkungen ein oder lassen Sie den Bereich leer.
„Which instrument are you using to run the experiment?“ (Mit welchem Gerät führen Sie das Experiment durch?)	„7500 Fast (96 Wells)“ (7500 Fast (96 Wells))
„What type of experiment do you want to set up?“ (Welche Art von Experiment möchten Sie einrichten?)	„Quantitation – Standard Curve“ (Quantifizierung – Standardkurve)
„Which reagents do you want to use to detect the target sequence?“ (Welche Reagenzien möchten Sie zum Nachweis der Zielsequenz verwenden?)	„TaqMan® Reagents“ (TaqMan® Reagents)
„Which ramp speed to you want to use in the instrument run?“ (Welche Ramping-Geschwindigkeit wollen Sie während des Gerätelaufs verwenden?)	„Fast“ (Schnell)

Schritt 2. Definieren der Ziele und Proben

6 Klicken Sie im Menü **Experiment** (Experiment) auf der linken Seite des Bildschirms unter **Setup** (Einrichtung) auf **Plate Setup** (Platteneinrichtung). Vergewissern Sie sich, dass die Registerkarte **Define Targets and Samples** (Ziele und Proben definieren) oben ausgewählt ist.

Die Hilfsmittel zum Definieren der Ziele und Proben werden in der Mitte des Bildschirms angezeigt.

7 Erstellen Sie in der Tabelle „Define Targets" (Ziele definieren) Ziele für N1, N2 und RP, wie in **Abbildung 7** gezeigt. Klicken Sie auf **Add New Target** (Neues Ziel hinzufügen), um bei Bedarf eine Zeile zur Tabelle hinzuzufügen.

Wählen Sie für die Auswahl **Quencher** (Quencher) **NFQ-MGB** (NFQ-MGB) für alle Ziele aus. Verwenden Sie für die Auswahl **Color** (Farbe) die Standardeinstellung oder wählen Sie die gewünschte Farbe aus.

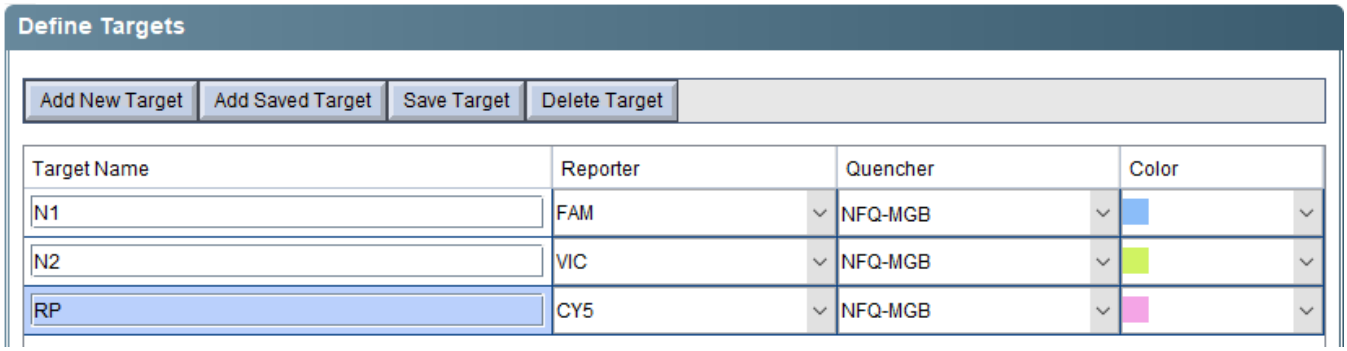


Abbildung 7 Definitionen der Ziele auf dem 7500 Software-Bildschirm „Plate Setup" (Platteneinrichtung)

8 Erstellen Sie in der Tabelle „Define Samples" (Proben definieren) Probennamen, wie in **Abbildung 8** gezeigt. Klicken Sie auf **Add New Sample** (Neue Probe hinzufügen), um bei Bedarf eine Zeile zur Tabelle hinzuzufügen.

Bei den drei Proben handelt es sich um die Humanprobenkontrolle (**HSC** (HSC)), die Kontrolle ohne Vorlage (**NTC** (NTC)) und die Positivkontrolle (**Pos** (Pos)) mit SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control. Beachten Sie, dass den Testproben kein Probenname zugewiesen wird.

Verwenden Sie für die Auswahl **Color** (Farbe) die Standardeinstellung oder wählen Sie die gewünschte Farbe aus.

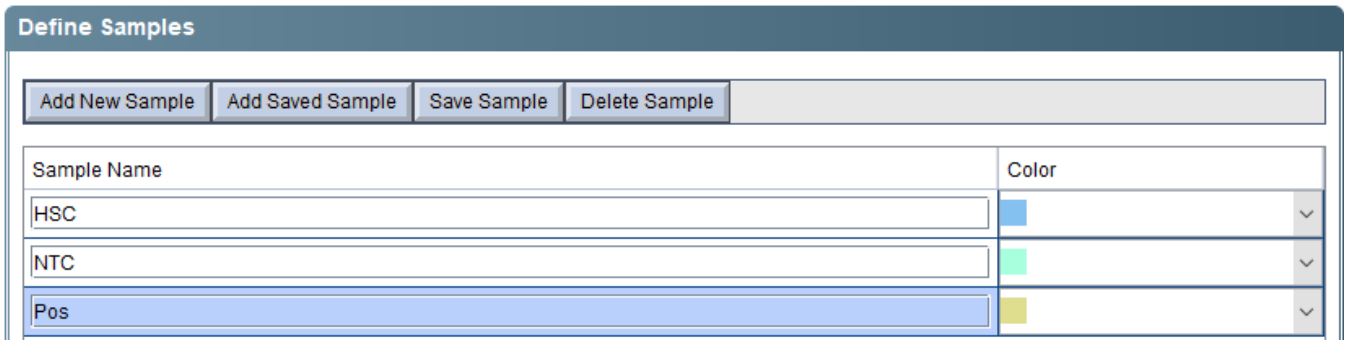


Abbildung 8 Definitionen der Proben auf dem 7500 Software-Bildschirm „Plate Setup" (Platteneinrichtung)

Schritt 3. Zuweisen von Zielen und Aufgaben

9 Klicken Sie im oberen Bereich des Bildschirms auf die Registerkarte **Assign Targets and Samples** (Ziele und Proben zuweisen). Stellen Sie sicher, dass die Registerkarte **View Plate Layout** (Platten-Layout anzeigen) ausgewählt ist.

Der Bildschirm zeigt eine Plattenkarte der 96-Well-Platte an.

10 Wählen Sie auf der Plattenkarte alle 96 Wells aus.

Die ausgewählten Wells sind blau hervorgehoben und in der Mitte mit einem weißen Oval versehen.

Die Auswahl aller 96 Wells ist sinnvoll, wenn in allen Wells der Platte eine qRT-PCR-Reaktion durchgeführt werden soll. Wenn eins der Platten-Wells leer bleibt, wählen Sie diese Wells in diesem Schritt nicht aus.

11 Markieren Sie in der Tabelle unter **Assign target(s) to the selected wells** (Ziel(e) den ausgewählten Wells zuweisen) alle drei Kontrollkästchen in der Spalte „Assign" (Zuweisen), um anzugeben, dass alle drei Ziele in allen Wells überwacht und gemeldet werden sollen. Stellen Sie sicher, dass in der Spalte „Task" (Aufgabe) für alle drei Ziele „U" (U) ausgewählt ist. Siehe **Abbildung 9**.

Die Plattenkarte zeigt ein Symbol für jedes Ziel in allen 96 Wells an.

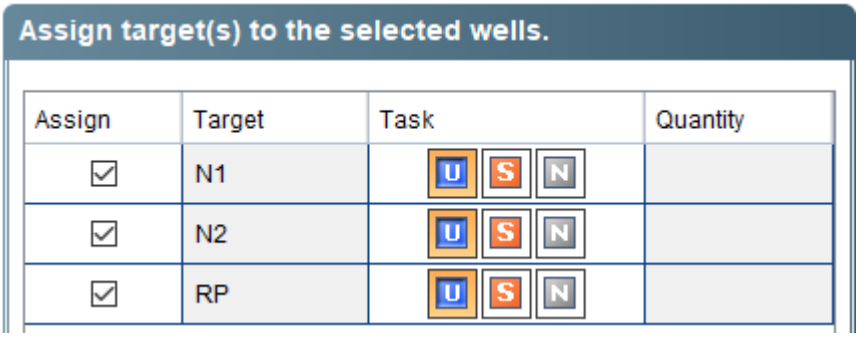


Abbildung 9 Zuweisungen der Ziele auf der 7500 Software-Registerkarte „View Plate Layout" (Platten-Layout anzeigen)

12 Ändern Sie die zugewiesene Aufgabe für das Well mit der Kontrolle ohne Vorlage.

a Wählen Sie auf der Plattenkarte das Well A12 aus.

b Ändern Sie in der Tabelle unter **Assign target(s) to the selected wells** (Ziel(e) den ausgewählten Wells zuweisen) die Auswahl in der Spalte „Task" (Aufgabe) für alle drei Ziele auf „N" (N). Achten Sie darauf, dass die Kontrollkästchen in der Spalte „Assign" (Zuweisen) markiert bleiben.

Die Plattenkarte wird nun wie in **Abbildung 10** angezeigt.

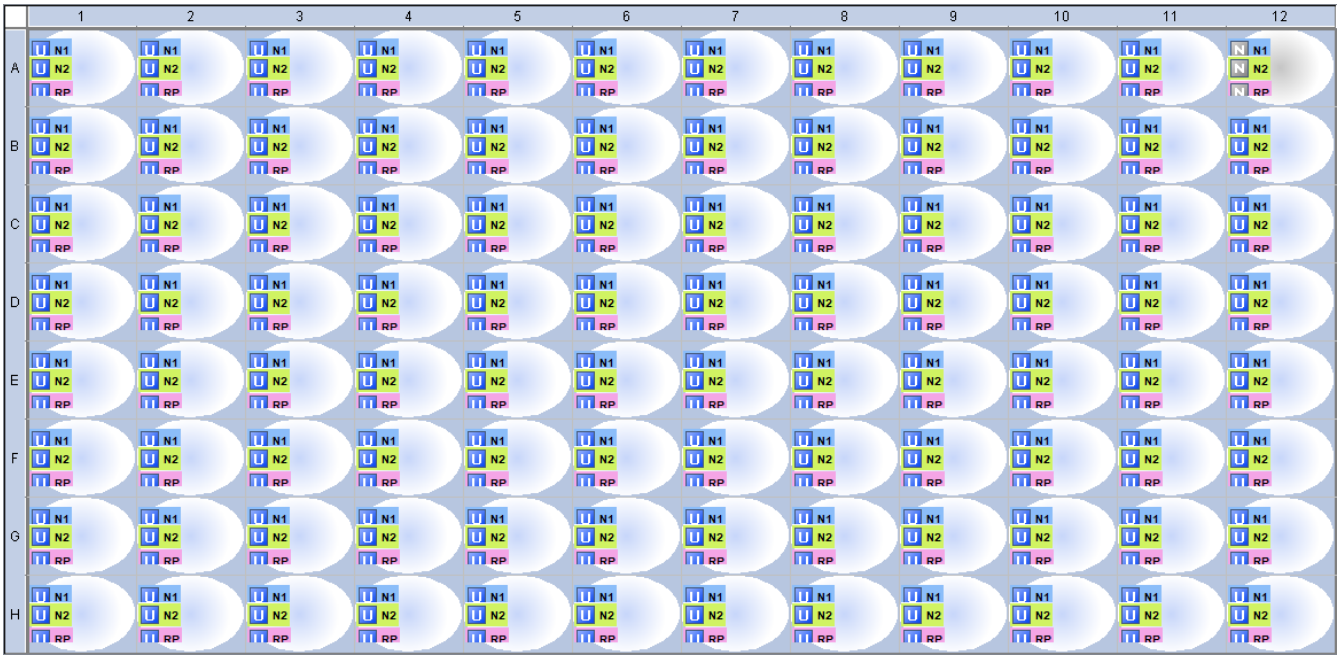


Abbildung 10 Plattenkarte auf dem 7500 System-Bildschirm „Plate Setup“ (Platteneinrichtung)

Schritt 4. Zuweisen von Kontrollproben

13 Weisen Sie dem Well A12 die Kontrolle ohne Vorlage zu.

a Wählen Sie das Well A12 auf der Plattenkarte aus.

b Markieren Sie in der Tabelle unter **Assign sample(s) to the selected wells** (Probe(n) den ausgewählten Wells zuweisen) die Option **NTC** (NTC).

Der Probenname „NTC“ (NTC) wird im ausgewählten Well angezeigt.

14 Weisen Sie dem Well B12 die Humanprobenkontrolle zu.

a Wählen Sie das Well B12 auf der Plattenkarte aus.

Wenn Sie mehr als eine Humanprobenkontrollprobe auf der Platte verwenden, wählen Sie die erforderliche Anzahl an zusätzlichen Wells in Spalte 12 auf der Plattenkarte aus.

b Markieren Sie in der Tabelle unter **Assign sample(s) to the selected wells** (Probe(n) den ausgewählten Wells zuweisen) die Option **HSC** (HSC).

Der Probenname „HSC“ (HSC) wird in den ausgewählten Wells angezeigt.

15 Weisen Sie die dem Well H12 die Probe SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control zu.

a Wählen Sie das Well H12 auf der Plattenkarte aus.

b Markieren Sie in der Tabelle unter **Assign sample(s) to the selected wells** (Probe(n) den ausgewählten Wells zuweisen) **Pos** (Pos).

Der Probenname „Pos“ (Pos) wird im ausgewählten Well angezeigt.

Schritt 5. Zuweisen des Referenzfarbstoffs

16 Wählen Sie in der Tabelle unter **Select the dye to use as the passive reference** (Farbstoff auswählen, der als passive Referenz verwendet werden soll) **ROX** (ROX) aus.

Schritt 6. Einrichten der Laufmethode

17 Klicken Sie im Menü **Experiment** (Experiment) auf der linken Seite des Bildschirms unter **Setup** (Einrichtung) auf **Run Method** (Laufmethode). Klicken Sie oben auf die Registerkarte **Tabular View** (Tabellarische Ansicht).

Die Hilfsmittel zum Definieren des Reaktionsvolumens und Temperaturprofils werden in der Mitte des Bildschirms angezeigt.

18 Stellen Sie sicher, dass das Feld **Reaction Volume Per Well** (Reaktionsvolumen pro Well) auf 20 µl eingestellt ist. Wenn dies nicht der Fall ist, geben Sie **20** in das Feld ein.

19 Stellen Sie das Temperaturprofil so ein, dass es dem in **Abbildung 11** angezeigten Profil entspricht. Die Einstellungen sind außerdem in **Tabelle 10** zusammengefasst.

Wenn Sie zu Beginn des Temperaturprofils eine neue Haltephase für den Schritt der reversen Transkription bei 50 °C hinzufügen müssen, führen Sie die folgenden Schritte aus.

a Wählen Sie die Phase ganz links in der Abbildung des Temperaturprofils aus.

b Klicken Sie auf **Add Stage** (Phase hinzufügen) **> Holding** (Halten).

Es wird eine neue Haltephase zu Beginn des Temperaturprofils eingefügt. Passen Sie Temperatur und Dauer an die Werte in **Abbildung 11** an.

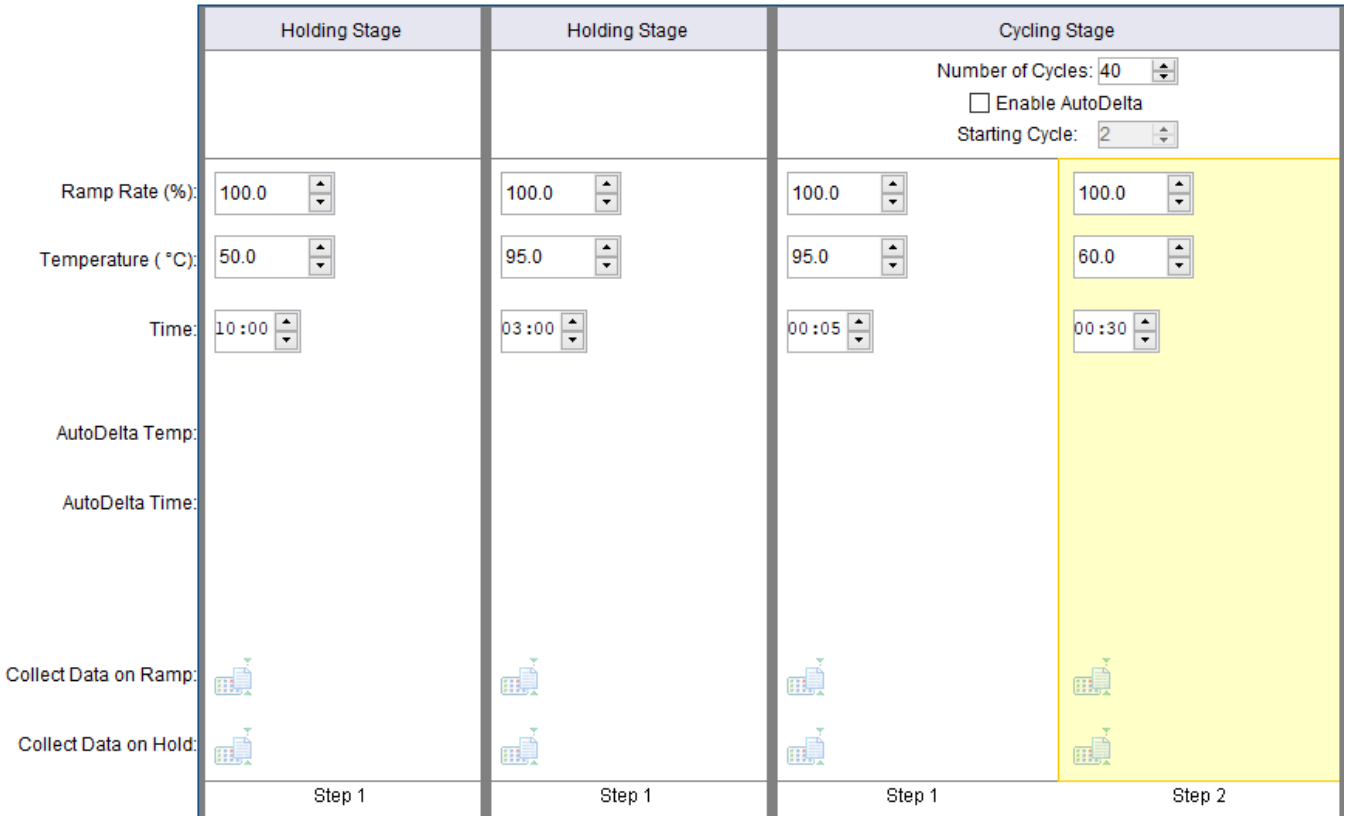


Abbildung 11 Temperaturprofil auf dem 7500 Software-Bildschirm „Run Method“ (Laufmethode)

Tabelle 10 Temperaturprofileinstellungen für das 7500 Fast Real Time PCR Instrument

Segmentnummer	Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur
1	1	10 Minuten	50 °C
2	1	3 Minuten	95 °C
3	40	5 Sekunden	95 °C
		30 Sekunden	60 °C

Schritt 7. Speichern des Experiments

20 Klicken Sie am oberen Rand des Bildschirms auf die nach unten gerichtete Pfeilspitze neben der Schaltfläche **Save** (Speichern), um das Menü mit den Speicheroptionen zu erweitern.

21 Wählen Sie im Menü **Save As** (Speichern unter) aus.

Das Dialogfeld „Save As" (Speichern unter) wird geöffnet.

22 Wählen Sie einen Ordner für die neue Experimentdatei aus.

23 Geben Sie im Feld „File name" (Dateiname) einen Namen für das Experiment ein.

24 Stellen Sie sicher, dass der Dateityp auf **Experiment Document Single files (*.eds)** (Experiment Document Single-Dateien (*.eds)) eingestellt ist.

25 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die Experimentdatei in dem angegebenen Ordner.

Schritt 8. Speichern des Experiments als Vorlage für die zukünftige Verwendung

26 Klicken Sie auf die nach unten gerichtete Pfeilspitze neben der Schaltfläche **Save** (Speichern), um das Menü mit den Speicheroptionen zu erweitern.

27 Wählen Sie im Menü **Save As Template** (Als Vorlage speichern) aus.

Das Dialogfeld „Save As Template" (Als Vorlage speichern) wird geöffnet.

28 Wählen Sie einen Ordner für die neue Vorlage aus.

29 Geben Sie in das Feld „File name" (Dateiname) **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR** ein.

30 Vergewissern Sie sich, dass der Dateityp auf **Experiment Document Template files (*.edt)** (Experiment Document Template-Dateien (*.edt)) eingestellt ist.

31 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die neue Vorlagendatei in dem angegebenen Ordner.

Verwenden Sie für zukünftige Assays die gespeicherte Vorlage, um das qRT-PCR-Experiment zu erstellen und einzurichten, siehe **„Erstellen des ABI 7500 Fast-Experiments aus der gespeicherten Vorlage."**

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen"** auf Seite 42 fort.

Erstellen des ABI 7500 Fast-Experiments aus der gespeicherten Vorlage

Wenn keine Vorlage des Experiments mit der erforderlichen Platteneinrichtung und dem Temperaturprofil erstellt wurde, siehe **„Erstellen und Einrichten des ABI 7500 Fast-Experiments (erforderlich, wenn noch keine Vorlage erstellt wurde)“** auf Seite 28.

Schritt 1. Erstellen des Experiments

1 Schalten Sie das ABI 7500 Fast-Gerät ein.

2 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Anwendung 7500 System Software.

3 Klicken Sie auf der Startseite unter **Set Up** (Einrichtung) auf **Template** (Vorlage).

Das Dialogfenster „Open“ (Öffnen) wird geöffnet.

4 Navigieren Sie im Dialogfeld zu dem Ordner, in dem die Vorlage gespeichert ist.

5 Doppelklicken Sie direkt auf die Datei **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR.edt**.

Das Gerät wird initialisiert.

Die 7500 System Software öffnet den Bildschirm „Experiment“ (Experiment) mit der Anzeige „Plate Setup“ (Platteneinrichtung).

Schritt 2. Speichern des Experiments

6 Klicken Sie am oberen Rand des Bildschirms auf die nach unten gerichtete Pfeilspitze neben der Schaltfläche **Save** (Speichern), um das Menü mit den Speicheroptionen zu erweitern.

7 Wählen Sie im Menü **Save As** (Speichern unter) aus.

Das Dialogfeld „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet.

8 Wählen Sie einen Ordner für die neue Experimentdatei aus.

9 Geben Sie im Feld „File name“ (Dateiname) einen Namen für das Experiment ein.

10 Stellen Sie sicher, dass der Dateityp auf **Experiment Document Single files (*.eds)** (Experiment Document Single-Dateien (*.eds)) eingestellt ist.

11 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die Experimentdatei in dem angegebenen Ordner.

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen“** auf Seite 42 fort.

Erstellen und Einrichten des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments (erforderlich, wenn noch keine gespeicherten Protokoll- und Plattendateien erstellt wurden)

Wenn bereits entsprechende Protokoll- und Plattendateien vorhanden sind, fahren Sie mit **„Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien“** auf Seite 41 fort.

Schritt 1. Erstellen des Experiments

1 Schalten Sie das Gerät CFX96 Touch Real-Time PCR ein.

2 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Bio-Rad CFX Maestro-Softwareanwendung.

3 Wählen Sie im Startassistenten aus der Dropdown-Liste **Select instrument** (Gerät auswählen) **CFX96** (CFX96) aus und klicken Sie dann auf **User-defined** (Benutzerdefiniert).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wird auf der Registerkarte „Protocol“ (Protokoll) geöffnet. Das Standard-Temperaturprofil wird auf der Mitte des Bildschirms angezeigt.

Schritt 2. Einrichten des Temperaturprofils

4 Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Express Load“ (Schnellladen) die Datei **2-Step_Amp.prcl** aus.

Das Temperaturprofil wird auf die Standardeinstellungen für ein 2-Schritt-Amplifikationsprotokoll aktualisiert, das für die Verwendung mit Fluoreszenzsonden geeignet ist.

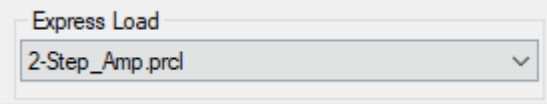


Abbildung 12 Auswahl von **2-Step_Amp.prcl** unter „Express Load“ (Schnellladen) auf der Registerkarte „CFX Maestro Protocol“ (CFX Maestro-Protokoll)

5 Klicken Sie auf **Edit Selected** (Auswahl bearbeiten).

Das Fenster „Protocol Editor“ (Protokoll-Editor) wird geöffnet.

6 Fügen Sie im Fenster „Protocol Editor“ (Protokoll-Editor) zu Beginn des Temperaturprofils einen Schritt für die reverse Transkription hinzu.

- **a** Wählen Sie Schritt 1 in der Abbildung des Temperaturprofils aus.
- **b** Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Insert Step“ (Schritt einfügen) die Option **Before** (Vorher) aus.
- **c** Klicken Sie auf **Insert Step** (Schritt einfügen).

  Ein neuer Schritt 1 wird vor dem ausgewählten Schritt hinzugefügt.
- **d** Bearbeiten Sie die Einstellungen für den neuen Schritt auf 50 °C für 10 Minuten.

7 Passen Sie die anderen Schritte des Temperaturprofils wie in **Abbildung 13** an. Die Einstellungen sind außerdem in **Tabelle 11** zusammengefasst. Stellen Sie sicher, dass der GOTO-Schritt (Schritt 5) auf eine 39-malige Wiederholung eingestellt ist.

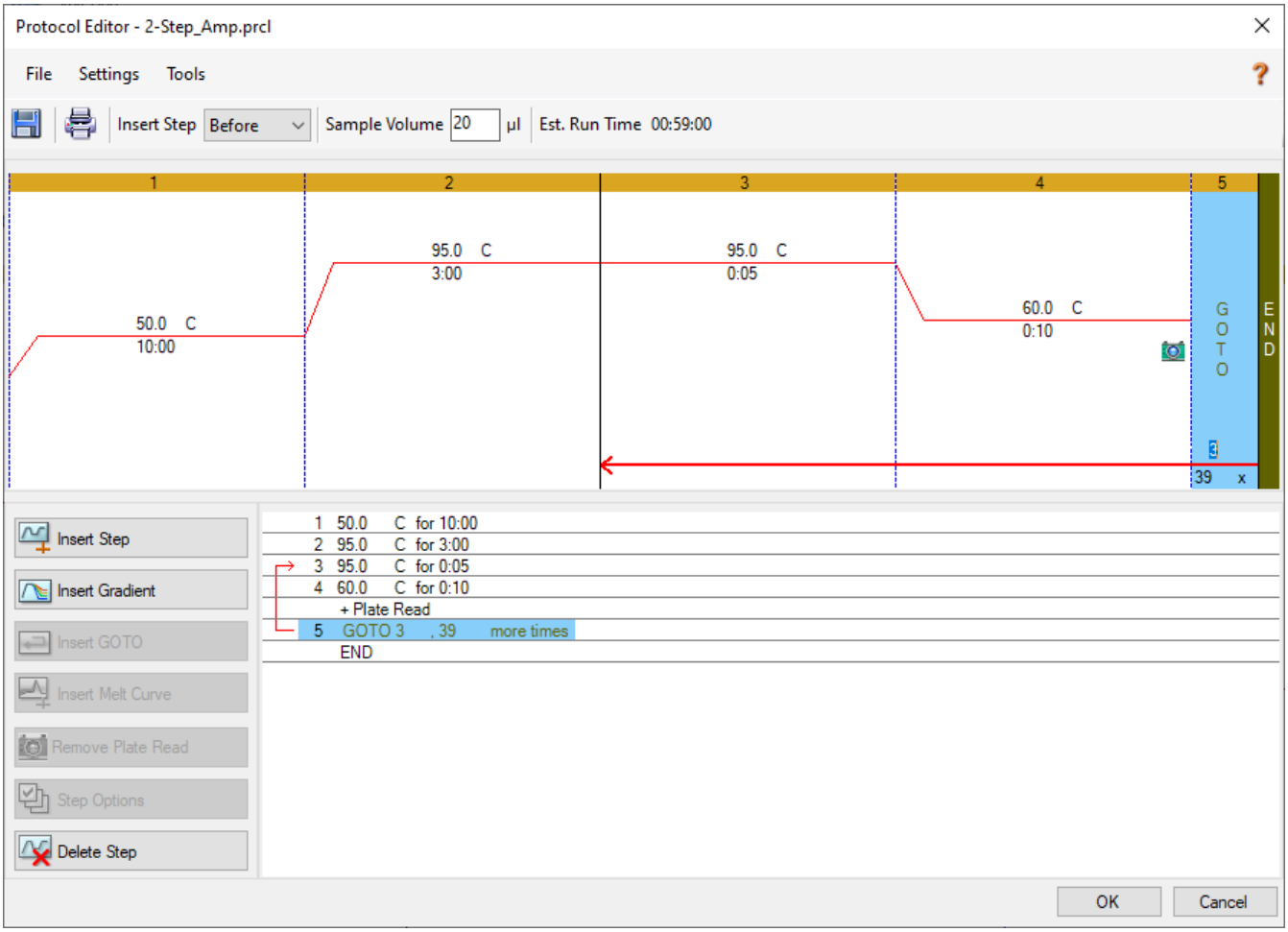


Abbildung 13 Temperaturprofil aus dem CFX Maestro-Bildschirm „Protocol Editor“ (Protokoll-Editor)

Tabelle 11 Temperaturzyklusprogramm für das Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Instrument

Segmentnummer	Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur
1	1	10 Minuten	50 °C
2	1	3 Minuten	95 °C
3	40	5 Sekunden	95 °C
		10 Sekunden	60 °C

Schritt 3. Speichern Sie die Protokolldatei.

8 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet und Sie werden aufgefordert, die Protokolldatei für das Experiment zu speichern. Die Protokolldatei enthält die Einstellungen aus der Registerkarte „Protocol“ (Protokoll) des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung).

9 Wählen Sie einen Ordner für die Protokolldatei aus.

10 Geben Sie in das Feld „File name“ (Dateiname) den Namen **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol** ein.

11 Stellen Sie sicher, dass der Dateityp auf **Protocol File (*.prcl)** (Protokolldatei (*.prcl)) eingestellt ist.

12 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die Protokolldatei in dem angegebenen Ordner.

13 Klicken Sie auf **OK** (OK), um das Fenster „Protocol Editor“ (Protokoll-Editor) zu schließen.

Verwenden Sie für zukünftige Assays die gespeicherte Protokolldatei, um die Registerkarte „Protocol“ (Protokoll) einzurichten, siehe **„Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien.“**

Schritt 4. Auswahl der Fluorophore und Zuweisen von Zielnamen

14 Klicken Sie am unteren Rand des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung) auf **Next** (Weiter).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wechselt zur Registerkarte „Plate“ (Platte). In der Mitte des Bildschirms wird eine Abbildung der Plattenkarte angezeigt.

15 Vergewissern Sie sich, dass die Dropdown-Liste „Scan Mode“ (Scan-Modus) auf **All Channels** (Alle Kanäle) eingestellt ist.

16 Klicken Sie auf **Edit Selected** (Auswahl bearbeiten).

Das Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor) wird geöffnet.

17 Klicken Sie im Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor) auf **Select Fluorophores** (Fluorophore auswählen).

Das Dialogfeld „Select Fluorophores“ (Fluorophore auswählen) wird geöffnet.

18 Markieren Sie im Dialogfeld die Kontrollkästchen für die Fluorophore **FAM** (FAM), **HEX** (HEX) und **Cy5** (Cy5). Deaktivieren Sie die Kontrollkästchen für alle anderen Fluorophore. Siehe **Abbildung 14**.

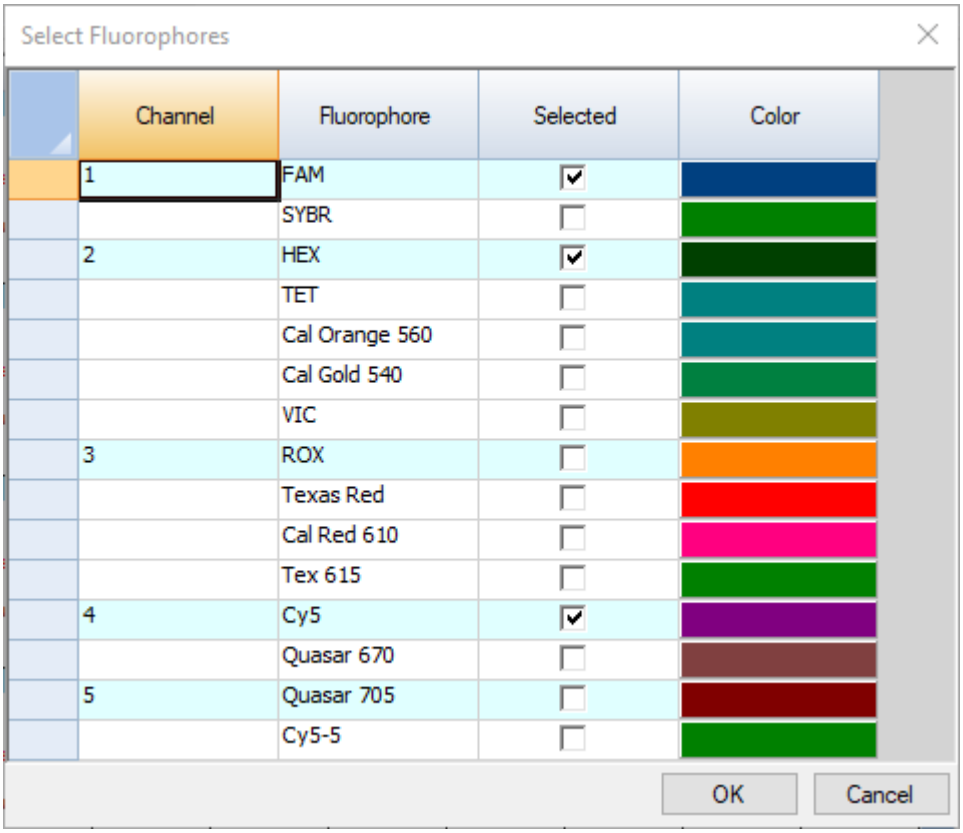


Abbildung 14 Auswahl der Fluorophore im CFX Maestro-Dialogfeld „Select Fluorophores“ (Fluorophore auswählen)

19 Klicken Sie auf **OK** (OK).

Das Dialogfeld „Select Fluorophores“ (Fluorophore auswählen) wird geschlossen. Die drei ausgewählten Fluorophore werden auf der rechten Seite des Fensters „Plate Editor“ (Platten-Editor) unter **Target Names** (Zielnamen) aufgelistet.

20 Wählen Sie alle Wells auf der Plattenkarte aus.

Die ausgewählten Wells sind blau hervorgehoben.

Die Auswahl aller 96 Wells ist sinnvoll, wenn in allen Wells der Platte eine qRT-PCR-Reaktion durchgeführt werden soll. Wenn eins der Platten-Wells leer bleibt, wählen Sie diese Wells in diesem Schritt nicht aus.

21 Vergewissern Sie sich, dass alle drei Fluorophore unter **Target Names** (Zielnamen) markiert sind und dass alle Wells die Namen aller drei Fluorophore anzeigen.

22 Geben Sie in die Felder neben den Namen der Fluorophore Zielnamen für die Fluorophore ein, wie in **Abbildung 15** gezeigt. Drücken Sie nach der Eingabe jedes Namens die **Eingabetaste**, um den Namen auf die Platten-Wells anzuwenden.

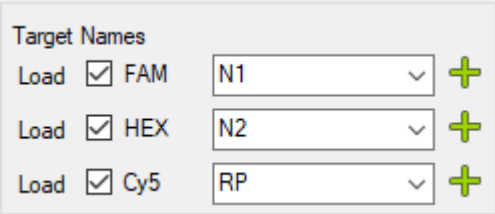


Abbildung 15 Zuweisungen der Zielnamen im CFX Maestro-Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor)

Schritt 5. Zuweisen von Probentypen und Probennamen

23 Weisen Sie den Probentyp für die Kontrolle ohne Vorlage zu.

a Wählen Sie das Well A12 auf der Plattenkarte aus.

b Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Sample Type“ (Probentyp) die Option **NTC** (NTC) aus.

Die Markierung **NTC** (NTC) wird oben im Well A12 angezeigt.

24 Vergewissern Sie sich, dass die restlichen Wells dem Probentyp „Unknown“ (Unbekannt) zugewiesen sind, wie durch die Beschriftung **Unk** (Unk) am oberen Rand der Wells angezeigt und in **Abbildung 16** dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	NTC N1 N2 RP
B	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
C	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
D	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
E	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
F	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
G	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP
H	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP	Unk N1 N2 RP

Abbildung 16 Zuweisungen der Probentypen im CFX Maestro-Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor)

25 Weisen Sie der Humanprobenkontrolle in Well B12 einen Probennamen zu.

a Wählen Sie das Well B12 auf der Plattenkarte aus.

Wenn Sie mehr als eine Humanprobenkontrollprobe auf der Platte verwenden, wählen Sie die erforderliche Anzahl an zusätzlichen Wells in Spalte 12 auf der Plattenkarte aus.

b Geben Sie in das Feld unter **Sample Names** (Probennamen) **HSC** (HSC) ein, wie in **Abbildung 17** gezeigt. Drücken Sie die **Eingabetaste**.

Der Probenname „HSC“ (HSC) wird in den ausgewählten Wells angezeigt.

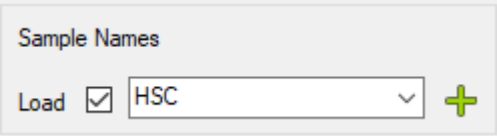


Abbildung 17 Hinzufügen des HSC-Probennamens im CFX Maestro-Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor)

26 Weisen Sie der Probe SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control in Well H12 einen Probennamen zu.

a Wählen Sie das Well H12 auf der Plattenkarte aus.

b Geben Sie in das Feld unter **Sample Names** (Probennamen) **Pos** (Pos) ein. Drücken Sie die **Eingabetaste**.

Der Probenname „Pos“ (Pos) wird im Well H12 angezeigt.

Schritt 6. Speichern der Plattendatei

27 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet und Sie werden aufgefordert, die Plattendatei für das Experiment zu speichern. Die Plattendatei enthält die Einstellungen aus der Registerkarte „Plate“ (Platte) des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung).

28 Wählen Sie einen Ordner für die Plattendatei aus.

29 Geben Sie in das Feld „File name“ (Dateiname) den Namen **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate** ein.

30 Stellen Sie sicher, dass der Dateityp auf **Plate File (*.pltd)** (Plattendatei (*.pltd)) eingestellt ist.

31 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen und das Programm speichert die Plattendatei in dem angegebenen Ordner.

32 Klicken Sie auf **OK** (OK), um das Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor) zu schließen.

33 Klicken Sie am unteren Rand des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung) auf **Next** (Weiter).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wechselt zur Registerkarte „Start Run“ (Lauf starten).

Verwenden Sie für künftige Assays die gespeicherte Plattendatei, um die Registerkarte „Plate“ (Platte) einzurichten, siehe **„Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien.“**

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen“** auf Seite 42 fort.

Erstellen des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments aus gespeicherten Protokoll- und Plattendateien

Wenn noch kein Experiment mit der erforderlichen Platteneinrichtung dem Temperaturprofil erstellt wurde, siehe **„Erstellen und Einrichten des Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR-Experiments (erforderlich, wenn noch keine gespeicherten Protokoll- und Plattendateien erstellt wurden)“** auf Seite 35.

Schritt 1. Erstellen des Experiments

1 Schalten Sie das Gerät CFX96 Touch Real-Time PCR ein.

2 Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC die Bio-Rad CFX Maestro-Softwareanwendung.

3 Wählen Sie im Startassistenten aus der Dropdown-Liste **Select instrument** (Gerät auswählen) **CFX96** (CFX96) aus und klicken Sie dann auf **User-defined** (Benutzerdefiniert).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wird auf der Registerkarte „Protocol“ (Protokoll) geöffnet. Das Standard-Temperaturprofil wird auf der Mitte des Bildschirms angezeigt.

Schritt 2. Laden der Protokolldatei

4 Klicken Sie auf **Select Existing** (Vorhandene Datei auswählen).

Das Dialogfeld „Select Protocol“ (Protokoll auswählen) wird geöffnet.

5 Navigieren Sie im Dialogfeld zu dem Ordner, in dem die Datei **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Protocol.prcl** gespeichert ist.

6 Doppelklicken Sie direkt auf die Protokolldatei.

Die Einstellungen aus der Protokolldatei werden in das Experiment geladen.

Schritt 3. Laden der Plattendatei

7 Klicken Sie am unteren Rand des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung) auf **Next** (Weiter).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wechselt zur Registerkarte „Plate“ (Platte). In der Mitte des Bildschirms wird eine Abbildung der Plattenkarte angezeigt.

8 Klicken Sie auf **Select Existing** (Vorhandene Datei auswählen).

Das Dialogfeld „Select Plate“ (Platte auswählen) wird geöffnet.

9 Navigieren Sie im Dialogfeld zu dem Ordner, in dem die Datei **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Plate.pltd** gespeichert ist.

10 Doppelklicken Sie direkt auf die Plattendatei.

Die Einstellungen aus der Plattendatei werden in das Experiment geladen.

11 Klicken Sie am unteren Rand des Bildschirms „Run Setup“ (Laufeinrichtung) auf **Next** (Weiter).

Der Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung) wechselt zur Registerkarte „Start Run“ (Lauf starten).

Fahren Sie an dieser Stelle direkt mit **„Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen“** auf Seite 42 fort.

Vorbereitung der qRT-PCR-Reaktionen

VORSICHTSHINWEIS

Bereiten Sie die qRT-PCR-Platte unmittelbar vor der Verwendung vor und lagern Sie sie stets auf Eis oder in einem Kühl-Rack, bis sie in das Echtzeit-PCR-Gerät geladen wird.

Schritt 1. Vorbereitung der qRT-PCR-Reagenzienmischung und der Platte in der Prä-PCR-Arbeitsstation

1 Tauen Sie alle gefrorenen qRT-PCR-Reagenzien auf Eis auf. Eine Liste der benötigten Reagenzien finden Sie unter **Tabelle 12**. Lagern Sie den 10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx und den Reference Dye Dx vor Licht geschützt.

2 Bereiten Sie eine 1:500-Verdünnung des bereitgestellten Reference Dye Dx mit nucleasefreiem Wasser vor (für eine Endkonzentration von 30 nM in den Reaktionen). Lagern Sie alle Lösungen, die den Referenzfarbstoff enthalten, vor Licht geschützt.

   Der verdünnte Reference Dye Dx kann, wenn er in einem lichtgeschützten Röhrchen bei 4 °C gelagert wird, innerhalb eines Tages für die Einrichtung weiterer Assays verwendet werden.

3 Bereiten Sie die Reagenzienmischung vor, indem Sie die Komponenten in **Tabelle 12** in der angegebenen Reihenfolge kombinieren. Bereiten Sie eine einzige Reagenzienmischung für alle Proben (3 Kontrollen und bis zu 93 Testproben) vor, indem Sie ein Vielfaches aller unten aufgeführten Komponenten verwenden. Lagern Sie die Reagenzienmischung auf Eis und vor Licht geschützt. Bereiten Sie die Reagenzienmischung erst kurz vor der Verwendung vor.

   - Wenn Sie 96 Reaktionen vorbereiten, bereiten Sie die Reagenzienmischung in einem 2-ml-Röhrchen vor.
   - Wenn Sie 48 Reaktionen vorbereiten, bereiten Sie die Reagenzienmischung in einem 1,5-ml-Röhrchen vor.

   Um Ihnen die Arbeit zu erleichtern, enthält **Tabelle 12** Volumina für die Vorbereitung von 1 Reaktion, 48 Reaktionen und 96 Reaktionen.

Tabelle 12 qRT-PCR-Reagenzienmischung

Komponente	Volumen für 1 Reaktion	Volumen für 48 Reaktionen (einschließlich Überschuss)	Volumen für 96 Reaktionen (einschließlich Überschuss)
Nucleasefreies Wasser	1,5 µl	81 µl	162 µl
2× Brilliant III Ultra-Fast qRT-PCR Master Mix Dx	10 µl	540 µl	1080 µl
10× SAR-CoV-2 Primer/Probe Mix Dx	2 µl	108 µl	216 µl
100 mM DTT Dx	0,2 µl	10,8 µl	21,6 µl
Verdünnter Reference Dye Dx (aus **Schritt 2**)	0,3 µl	16,2 µl	32,4 µl
RT/RNase Block Dx	1 µl	54 µl	108 µl

4 Mischen Sie die Reagenzienmischung vorsichtig ohne Blasenbildung auf einem Vortexer und drehen Sie das Röhrchen dann 5 Sekunden lang in einer Mikrozentrifuge.

5 Verteilen Sie 15 µl der Reagenzienmischung wie folgt in den Wells der 96-Well-Platte.

   a Legen Sie ein sauberes 8-x-Röhrchenstreifen in ein 96-Well-Kühl-Rack.

   b Geben Sie 190 µl der Reagenzienmischung (bei 96 Reaktionen) oder 100 µl der Reagenzienmischung (bei 48 Reaktionen) in jedes der 8 Röhrchen des Streifens. Entfernen Sie ggf. größere Blasen, die sich am Boden der Röhrchen befinden.

   c Übertragen Sie mit einer Mehrkanalpipette 15 µl der Reagenzienmischung aus dem 8-Well-Streifenröhrchen auf die Säulen der 96-Well-Platte. Lagern Sie die Platte während des gesamten Vorgangs auf Eis oder in einem 96-Well-Kühl-Rack und schützen Sie sie vor Licht.

HINWEIS Wenn Sie nur 48 Reaktionen durchführen, lassen Sie die Spalten 1 bis 6 leer.

6 Bringen Sie die Platte abgedeckt in den für die Probenzugabe vorgesehenen Bereich der Prä-PCR-Arbeitsstation. Lagern Sie die Platte auf Eis oder in einem Kühl-Rack.

Schritt 2. Hinzufügen der Kontroll- und Testproben zur qRT-PCR-Platte in der Prä-PCR-Arbeitsstation (Probenzugabebereich)

7 Verdünnen Sie die SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control auf eine Stammlösung von 10 Kopien/µl.

   a Geben Sie 99 µl nucleasefreies Wasser in ein sauberes 1,5-ml-Röhrchen. Geben Sie in dieses Röhrchen 1 µl der unverdünnten SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control. Gründlich mit einem Vortexer mischen und anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge drehen.

   b Geben Sie 99 µl nucleasefreies Wasser in ein weiteres, sauberes 1,5-ml-Röhrchen. Geben Sie in dieses Röhrchen 1 µl der verdünnten SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control, die in **Schritt a** hergestellt wurde. Gründlich mit einem Vortexer mischen und anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge drehen.

   Dieses Röhrchen enthält die Stammlösung der SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control mit einer Konzentration von 10 Kopien/µl.

Die Stammlösung kann, wenn sie bei 4 °C gelagert wird, innerhalb eines Tages für die Einrichtung weiterer Assays verwendet werden. Lagern Sie die Originalstammlösung der SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control bei –80 °C.

8 Richten Sie die Kontrollreaktionen wie in **Abbildung 18** gezeigt ein.

- Geben Sie für die Kontrolle ohne Vorlage (NTC) 5 µl nucleasefreies Wasser in das Well A12.
- Für die Humanprobenkontrolle (HSC) wird die aus der Humanprobenkontrolle vorbereitete RNA kurz auf dem Vortexer gemischt. Geben Sie dann 5 µl der RNA in das Well B12.

  Wenn Sie mehr als eine HSC-Probe auf der Platte verwenden, nutzen Sie die zusätzlichen Wells in Spalte 12, wie beim Einrichten der Platte in der Software des qRT-PCR-Geräts angegeben.
- Geben Sie für die SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control (Pos) 5 µl der verdünnten SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control in das Well H12.

9 Richten Sie die Reaktionen für die Testproben (S1 bis S93) wie in **Abbildung 18** gezeigt ein. Wechseln Sie Ihre Handschuhe regelmäßig, um eine Kontamination zu vermeiden.

- Mischen Sie die aus den Testproben vorbereiteten RNA-Proben kurz auf dem Vortexer. Anschließend für 5 Sekunden in einer Mikrozentrifuge drehen.
- Geben Sie für jede Probe 5 µl in ein Well auf der qRT-PCR-Platte. Verfolgen Sie sorgfältig, welche Probe in das jeweilige Well gegeben wurde. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Zugabe.
- Wenn die qRT-PCR-Platte mit einem Klebestreifen verschlossen werden soll, mischen Sie die Reaktionen vor dem Verschließen durch kurzes Auf- und Abpipettieren der Mischungen, ohne dabei Blasen zu bilden.

HINWEIS Wenn Sie nur 48 Reaktionen durchführen, lassen Sie die mit S1 bis S48 beschrifteten Platten-Wells leer.

10 Verschließen Sie die Platte entweder mit einem Klebestreifen oder mit Röhrchenkappenstreifen.

11 Wenn die Platte mit Röhrchenkappenstreifen verschlossen wird, mischen Sie sie kurz auf einem Vortexer. (Verwenden Sie keinen Vortexer für Platten, die mit Klebestreifen verschlossen werden.)

12 Drehen Sie die Platte kurz in einer Plattenzentrifuge.

13 Wenn Sie das Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System verwenden und die Platte mit einem Klebestreifen verschlossen haben, geben Sie ein Kompressionspad über die Platte.

14 Fahren Sie direkt mit der Durchführung der qRT-PCR auf Ihrem Echtzeit-PCR-System fort.

- Siehe **„Durchführen der qRT-PCR auf dem Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System“** auf Seite 47.
- Siehe **„Durchführen der qRT-PCR auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument“** auf Seite 56.
- Siehe **„Durchführen der qRT-PCR auf dem Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System“** auf Seite 63.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	NTC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	HSC
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S89
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S90
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S91
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S92
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S93
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	Pos

Abbildung 18 Platteneinrichtung für die Testproben 1–93 und Kontrollproben (Kontrolle ohne Vorlage [NTC], Humanprobenkontrolle [HSC] und Synthetic Positive RNA Control Dx [Pos])

5 Anweisungen zur Durchführung der qRT-PCR

Durchführen der qRT-PCR auf dem Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System **47**
Durchführen der qRT-PCR auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument **56**
Durchführen der qRT-PCR auf dem Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System **63**

Dieses Kapitel enthält Anweisungen zur Durchführung des qRT-PCR-Zyklusprogramms auf dem ausgewählten Echtzeit-PCR-Gerät.

Durchführen der qRT-PCR auf dem Agilent AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System

Dieser Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise zur Durchführung der qRT-PCR auf einem Agilent AriaMx oder AriaDx Real-Time PCR System.

Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem AriaMx/AriaDx-System

1. Stellen Sie sicher, dass das AriaMx/AriaDx-Gerät eingeschaltet ist.
2. Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC das Experiment, das Sie zuvor in der Aria-Anwendung erstellt haben.
3. Navigieren Sie zum Bildschirm „Thermal Profile“ (Temperaturprofil), zum Bildschirm „Run Status“ (Laufstatus) oder zum Bildschirm „Raw Data Plots“ (Rohdatenplots).
4. Klicken Sie auf **Run** (Ausführen).

   Das Dialogfeld „Instrument Explorer“ (Geräte-Explorer) wird geöffnet.
5. Suchen Sie das Gerät, das für den Lauf verwendet wird, und klicken Sie auf **Send Config** (Konfiguration senden). (Anweisungen zum Suchen und Hinzufügen von Geräten finden Sie im AriaMx- oder AriaDx-Einrichtungs- und Benutzerhandbuch.)
   - Wenn Sie seit dem letzten Start des Aria-Programms zum ersten Mal eine erneute Verbindung zu einem Gerät herstellen, wird das Dialogfeld „Login“ (Anmeldung) geöffnet. Wählen Sie Ihren Benutzernamen aus der Dropdown-Liste, geben Sie Ihr Anmeldepasswort in das Feld „Password“ (Passwort) ein und klicken Sie auf **Login** (Anmelden). Um sich mit einem anderen Benutzerkonto anzumelden, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Gerätenamen und dann auf **Log off current user** (Aktuellen Benutzer abmelden). Sie können sich dann mit dem gewünschten Benutzerkonto anmelden.
   - Wenn das Experiment noch nicht gespeichert ist, werden Sie vor dem Fortfahren aufgefordert, das Experiment zu speichern.
6. Bringen Sie Ihre Reaktionsplatte zum Gerät und laden Sie sie in den Thermoblock.
7. Öffnen Sie auf dem Touchscreen des Geräts das vorbereitete Experiment auf dem Bildschirm „Thermal Profile“ (Temperaturprofil) und drücken Sie auf **Run Experiment** (Experiment ausführen).

   Das Gerät beginnt mit der Durchführung des Experiments.
8. Kehren Sie zum PC-Programm zurück. Das Programm leitet Sie zum Bildschirm „Run Status“ (Laufstatus), wo Sie den Fortschritt des Laufs überwachen können.

   Eine Überwachung des Laufs ist nicht erforderlich. Wenn Sie die Aria-Software vor Abschluss des Laufs schließen, beachten Sie, wo die Experimentdatei nach dem Lauf gespeichert wird.

Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das AriaMx/AriaDx-Experiment

Schritt 1. Anzeigen der Amplifikations-Plots für alle Ziele in allen Wells

1 Öffnen Sie die Experimentdatei nach Abschluss des Laufs in der Aria-Software.

2 Klicken Sie auf der linken Seite des Bildschirms auf **Analysis Criteria** (Analysekriterien).

Der Bildschirm „Analysis Criteria“ (Analysekriterien) wird geöffnet, auf dem Sie die Einstellungen für die Analyse festlegen können.

3 Stellen Sie sicher, dass alle Wells, Well-Typen und Ziele für die Analyse ausgewählt sind, wie in **Abbildung 19** gezeigt.

HINWEIS Wenn die Platte leere Wells enthält, stellen Sie sicher, dass diese auf der Registerkarte „Plate Setup“ (Platteneinrichtung) dem Well-Typ „Blank“ (Leer) zugewiesen sind.

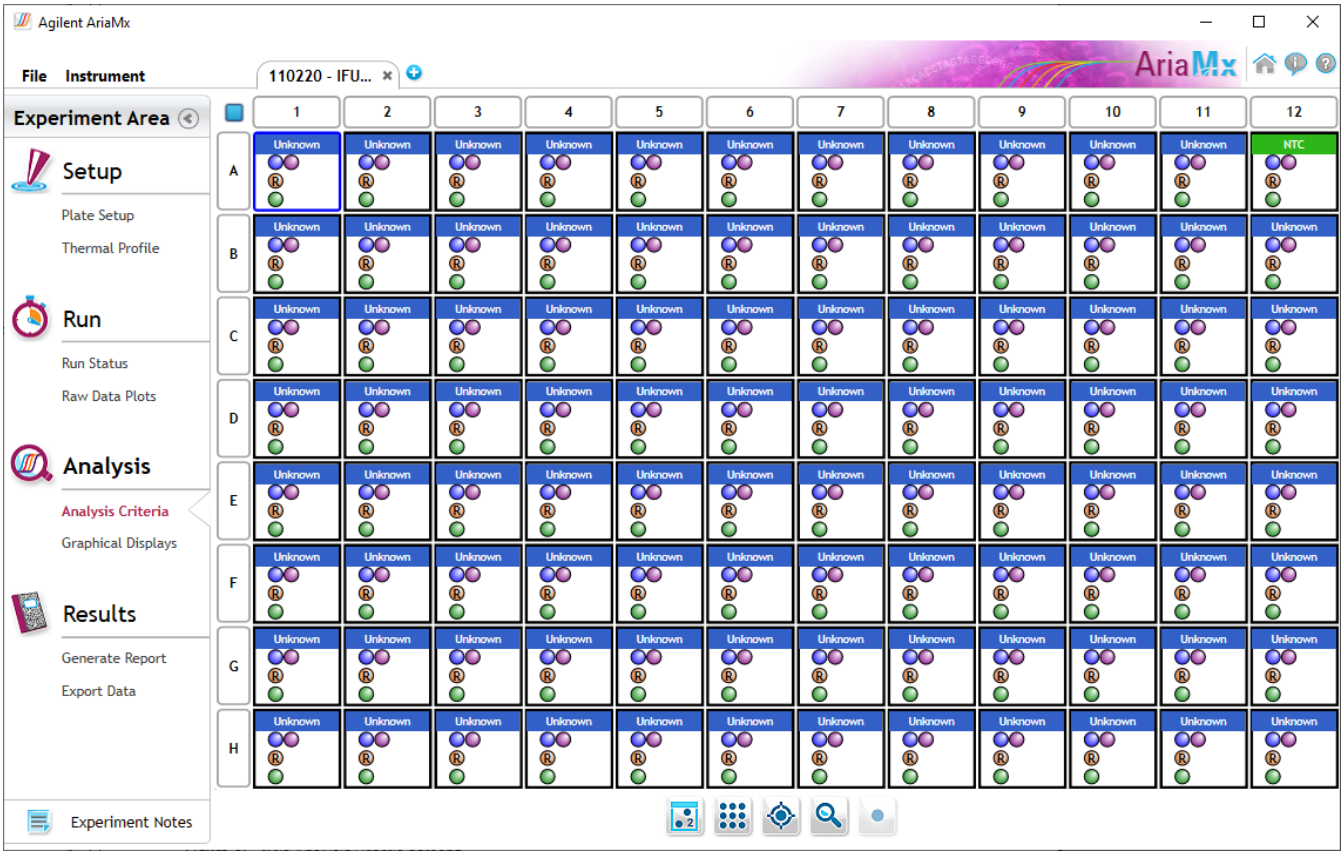


Abbildung 19 Aria-Bildschirm „Analysis Criteria“ (Analysekriterien)

4 Klicken Sie auf der linken Seite des Bildschirms auf **Graphical Displays** (Grafische Anzeigen).

Der Bildschirm „Graphical Displays“ (Grafische Anzeigen) wird geöffnet, der die Daten mit Hilfsmitteln zum Einstellen der Analyseparametern anzeigt.

5 Vergewissern Sie sich, dass der Bildschirm das Diagramm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) anzeigt und dass die Standard-Analyseparameter mit den Werten in **Abbildung 20** übereinstimmen.

Wenn nicht die gesamte Auswahl der Analyseparameter wie in **Abbildung 20** angezeigt wird, klicken Sie auf die nach unten gerichtete Pfeilspitze direkt unter der Einstellung **Smoothing** (Glättung), um die Auswahl zu erweitern.

Beachten Sie, dass die Standard-Fluoreszenzschwellenwerte in Ihrem Experiment wahrscheinlich von den in **Abbildung 20** gezeigten Werten abweichen. Die Software berechnet die Standardwerte auf der Grundlage des Fluoreszenzrauschpegels im Hintergrundzyklusbereich. Daher variieren die Standardwerte zwischen den Experimenten.

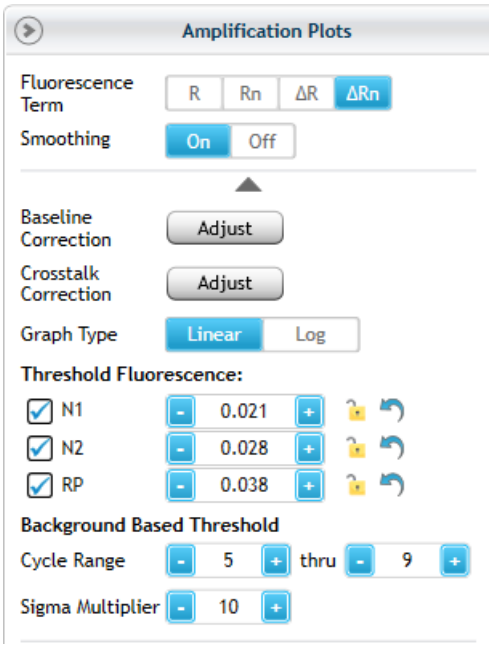


Abbildung 20 Standardeinstellungen für Amplifikations-Plots in der Aria-Software (Fluoreszenzschwellenwerte variieren je nach Experiment)

6 Stellen Sie unter **Background Based Threshold** (Hintergrundbasierter Schwellenwert) sicher, dass der Standardzyklusbereich zwischen 5 und 9 liegt.

7 Prüfen Sie, ob Amplifikations-Plots mit einer frühen Amplifikation vorhanden sind (d. h. vor Zyklus 9). Schließen Sie alle Testproben mit früher Amplifikation von der Analyse aus und führen Sie einen erneuten Test mit einer niedrigeren Konzentration durch.

In Testproben mit ungewöhnlich hohen Konzentrationen viraler RNA kann die Amplifikation der viralen Ziele bereits bei einer sehr frühen Zyklusanzahl (< 9) nachweisbare Werte erreichen. Als Teil der Basislinienkorrekturberechnungen kann die Software solche frühen Amplifikationssignale als Hintergrundrauschen interpretieren, sodass den viralen Zielen in diesen Proben kein Cq-Wert zugewiesen wird.

Prüfen Sie das Vorhandensein derartiger Testproben, indem Sie die Amplifikations-Plots ohne Basislinienkorrektur (Fluoreszenzkonstante R oder Rn) anzeigen. Wenn eine der Testproben vor Zyklus 9 Anzeichen einer Amplifikation zeigt, entfernen Sie diese Wells aus der Analyse, indem Sie deren Auswahl auf dem Bildschirm „Analysis Criteria“ (Analysekriterien) aufheben. Führen Sie die qRT-PCR-Reaktion für die Probe erneut durch, indem Sie die Nukleinsäure in einem 1:100-Verhältnis mit dem entsprechenden Elutionspuffer verdünnen.

Schritt 2. Bewerten der Schwellenwerte

8 Schalten Sie in der Einstellung „Graph Type“ (Diagrammtyp) die Auswahl von **Linear** (Linear) auf **Log** (Log) um. Stellen Sie sicher, dass die Fluoreszenzkonstante auf **ΔRn** eingestellt ist.

Die Darstellung der Amplifikations-Plots in logarithmischen Werten ermöglicht eine bessere Ansicht des Hintergrundsignalrauschens. Siehe Beispiel in **Abbildung 21**. Die Schwellenwertlinie für jedes Ziel wird als horizontale Gerade dargestellt.

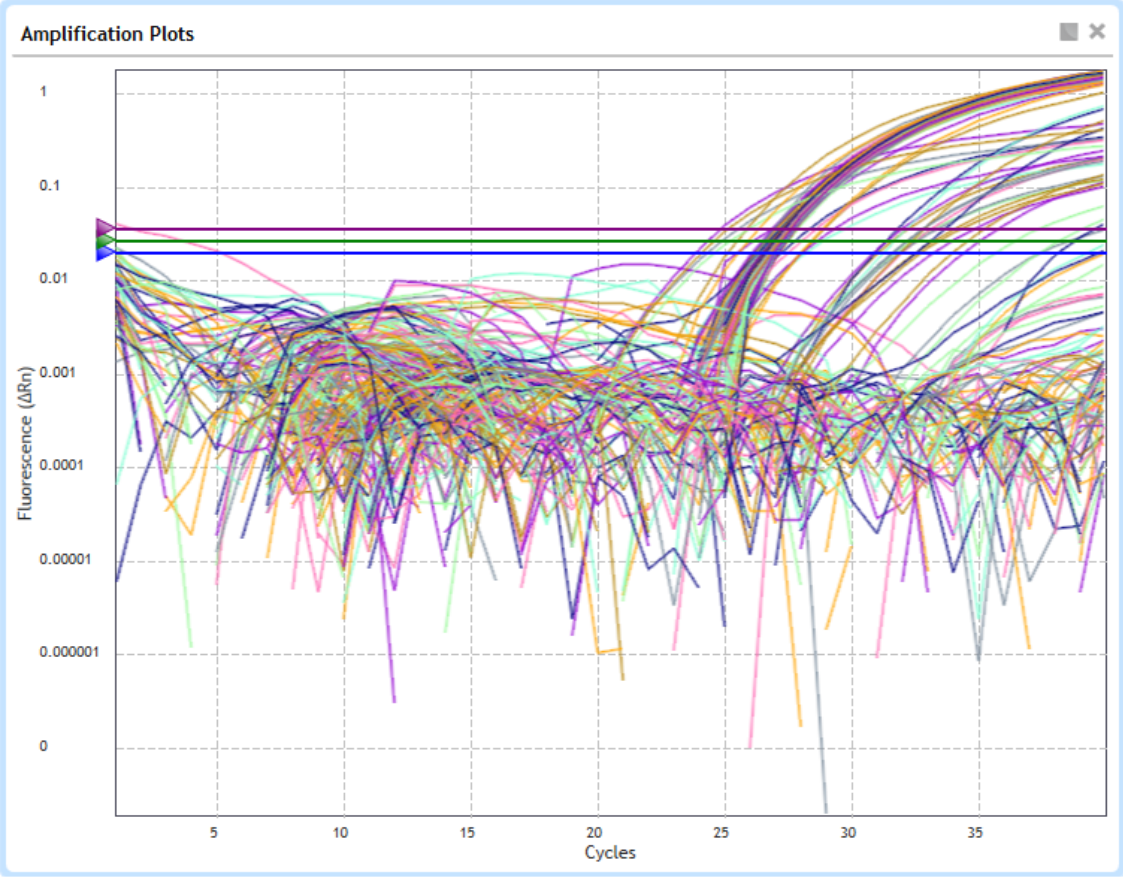


Abbildung 21 Aria-Bildschirm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) in logarithmischer Skala – Zielschwellenwerte werden als horizontale Geraden dargestellt

9 Führen Sie eine optische Bewertung der Amplifikations-Plots und der Standardschwellenwerte für das N1-Ziel aus.

- **a** Klicken Sie auf das Symbol zum Anzeigen der Ziele, das sich unter dem Diagramm befindet.
- **b** Deaktivieren Sie in dem sich öffnenden Menü die Kontrollkästchen für alle anderen Ziele, sodass nur das N1-Ziel im Diagramm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) angezeigt wird.
- **c** Bestimmen Sie, ob der Schwellenwert sowohl hoch genug ist, um über dem Hintergrundrauschen zu liegen, als auch niedrig genug, um die Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase einzubeziehen (siehe **Abbildung 23**). Gehen Sie auf der Grundlage dieser Bestimmung wie in **Tabelle 13** beschrieben vor.

10 Wiederholen Sie **Schritt 9** für das N2-Ziel und erneut für das RP-Ziel.

11 Stelle Sie unter **Threshold Fluorescence** (Fluoreszenzschwellenwert) sicher, dass alle drei Ziele markiert und alle drei Fluoreszenzschwellenwerte gesperrt sind, wie in **Abbildung 22** gezeigt.

12 Klicken Sie auf das Symbol zum Anzeigen der Ziele, das sich unter dem Diagramm befindet. Stellen Sie sicher, dass alle Ziele ausgewählt sind.

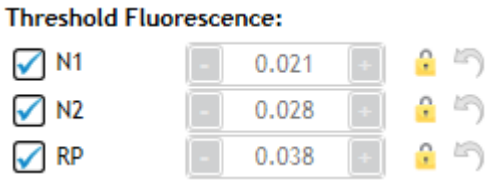


Abbildung 22 Ausgewählte Ziele und gesperrte Fluoreszenzschwellenwerte

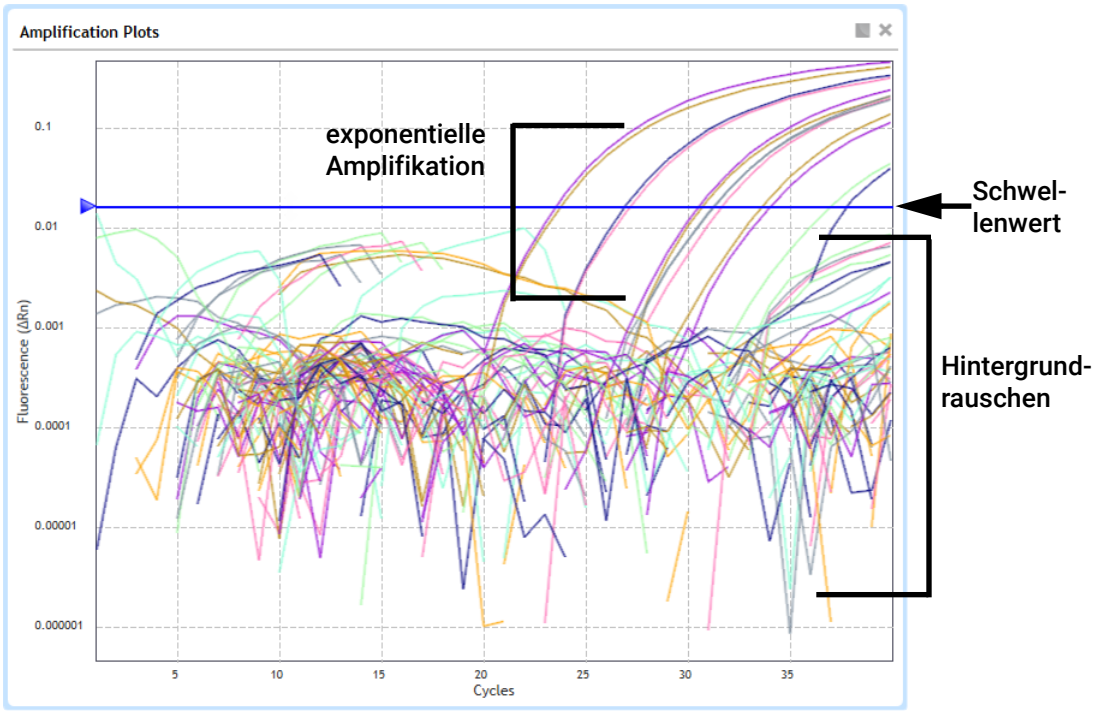


Abbildung 23 Aria-Bildschirm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) für das N1-Ziel

Tabelle 13 Überprüfen der optimalen Schwellenwerteinstellung in der Aria-Software

Position des Schwellenwerts	Beschreibung	Aktion
Optimale Position	Über dem Hintergrundrauschen und umfasst alle Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase	• Sperren Sie den Fluoreszenzschwellenwert auf der rechten Seite des Bildschirms, indem Sie auf das Schlosssymbol klicken. Wenn der Wert gesperrt ist, befindet sich das Schlosssymbol in der geschlossenen Position. Das Sperren des Werts verhindert, dass sich der Wert ändert, wenn eines der Analysekriterien geändert wird.
Zu hoch	Einige Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase übersteigen den Schwellenwert nicht	• Suchen Sie nach Wells mit außergewöhnlich hohem Hintergrundrauschen. Diese Ausreißer-Wells können dazu führen, dass die Software den Schwellenwert zu hoch ansetzt. • Gehen Sie zurück zum Bildschirm „Analysis Criteria“ (Analysekriterien), um dieses Well von der Analyse auszuschließen. Die Software berechnet den Schwellenwert neu, sobald das Ausreißer-Well ausgeschlossen wurde. Alternativ können Sie die Schwellenwertgerade im Diagramm mit der Maus manuell an eine neue Position ziehen. • Vergewissern Sie sich, dass sich der neue Schwellenwert in einer optimalen Position befindet und sperren Sie den Fluoreszenzschwellenwert wie oben beschrieben. • Sobald der neue Wert gesperrt ist, kehren Sie erneut zum Bildschirm „Analysis Criteria“ (Analysekriterien) zurück, um das Ausreißer-Well erneut in die Analyse einzubeziehen.* * Wenn der Amplifikations-Plot für das Ausreißer-Well bei keiner Zykluszahl eine exponentielle Amplifikation zeigt, stellen Sie sicher, dass der abgesenkte Schwellenwert nicht dazu führt, dass die Software dem Well einen Cq-Wert zuweist (aufgrund von Hintergrundsignalrauschen, das den Schwellenwert übersteigt). Wenn dies der Fall ist, versuchen Sie, weitere Analyseeinstellungen für dieses Well zu ändern, z. B. die Einstellung für die Basislinienkorrektur.
Zu niedrig	Einige Plots liegen nicht über dem Hintergrundrauschen.	• Erhöhen Sie den Schwellenwert bis knapp über den Hintergrundrauschpegel.

Schritt 3. Überprüfen der Ergebnisse im NTC-Well

13 Suchen Sie in der Tabelle „Results“ (Ergebnisse) die Reaktion der Kontrolle ohne Vorlage (NTC), die sich in Well A12 befindet.

14 Stellen Sie sicher, dass die Cq-Spalte für alle drei Ziele „No Cq“ (Kein Cq-Wert) anzeigt oder einen Cq-Wert > 37,00 aufweist.

Wenn die NTC-Reaktion einen Cq-Wert ≤ 37,00 für eines der Ziele aufweist, deutet dies möglicherweise auf eine Probenkontamination hin. Erklären Sie den Lauf für ungültig und wiederholen Sie den Assay unter strikter Einhaltung der Richtlinien.

Exportieren der Daten aus der Aria-Software

Schritt 1. Definieren und Speichern der Exporteinstellungen

Wenn die Exporteinstellungen bereits gespeichert wurden, fahren Sie direkt mit **„Schritt 2. Exportieren der Daten“** auf Seite 55 fort.

1 Klicken Sie auf der linken Seite des Bildschirms unter **Results** (Ergebnisse) auf **Export Data** (Daten exportieren).

Der Bildschirm „Export Data“ (Daten exportieren) wird geöffnet.

2 Wählen Sie im Bereich „Export Configuration“ (Exportkonfiguration) einen Dateityp für die exportierten Daten aus, z. B. **Excel** (Excel).

3 Stellen Sie unter **Items** (Elemente) sicher, dass das Kontrollkästchen „Tabular Results“ (Tabellarische Ergebnisse) markiert ist. Deaktivieren Sie die Kontrollkästchen für die anderen Elemente. Siehe **Abbildung 24**.

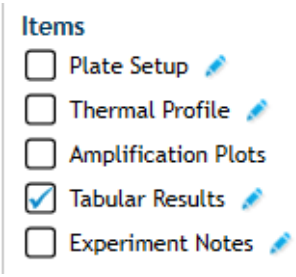
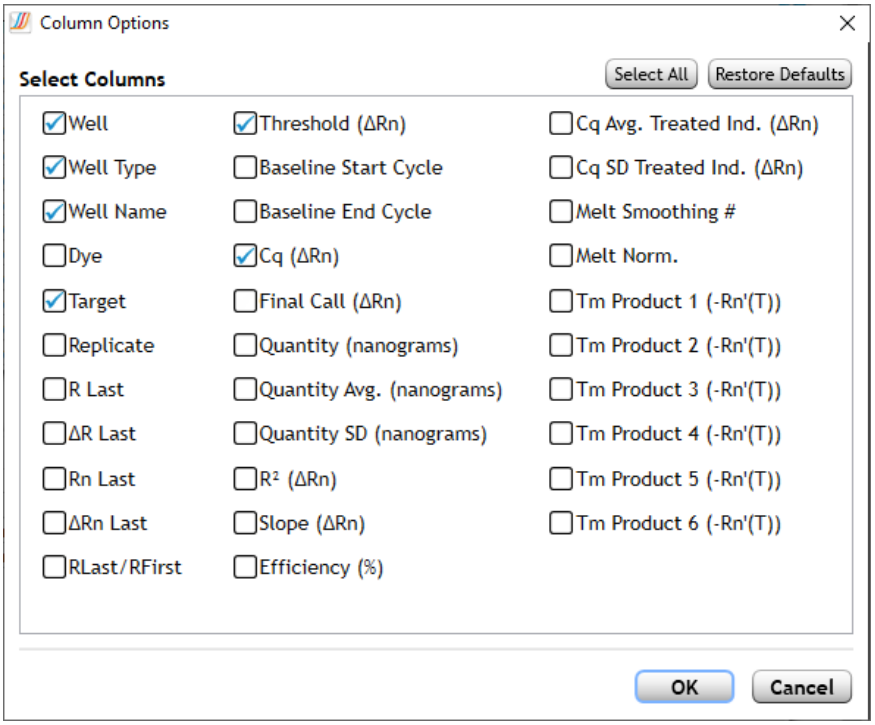


Abbildung 24 Aria-Softwarebildschirm „Export Data“ (Daten exportieren) – zu exportierende Elemente

4 Klicken Sie auf das Stiftsymbol neben **Tabular Results** (Tabellarische Ergebnisse), um festzulegen, welche Datenspalten einbezogen werden sollen.

Das Dialogfeld „Columns Options“ (Spaltenoptionen) wird geöffnet.

5 Passen Sie die Einstellungen so an, dass nur die Spalten markiert sind, die in **Abbildung 25** angezeigt werden.



Markierte Spalten:

„Well“ (Well)

„Well Type“ (Well-Typ)

„Well Name“ (Well-Name)

„Target“ (Ziel)

„Threshold“ (Schwellenwert)

„Cq“ (Cq)

Abbildung 25 Aria-Dialogfeld „Column Options“ (Spaltenoptionen)

6 Klicken Sie auf **OK** (OK), um Ihre Änderungen zu speichern und das Dialogfeld zu schließen.

7 Speichern Sie die Exporteinstellungen als neue Definition.

   a Erweitern Sie im Bereich „Export Configuration“ (Exportkonfiguration) die Dropdown-Liste „Definition“ (Definition).

   b Klicken Sie auf **Add New** (Neu hinzufügen).

   Das Dialogfeld „Add New Definition“ (Neue Definition hinzufügen) wird geöffnet.

   c Geben Sie in das Feld „Definition Name“ (Definitionsname) **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data** ein. Siehe **Abbildung 26**.

   d Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen „Use Current Settings“ (Aktuelle Einstellungen verwenden) markiert ist.

   e Klicken Sie auf **Add** (Hinzufügen).

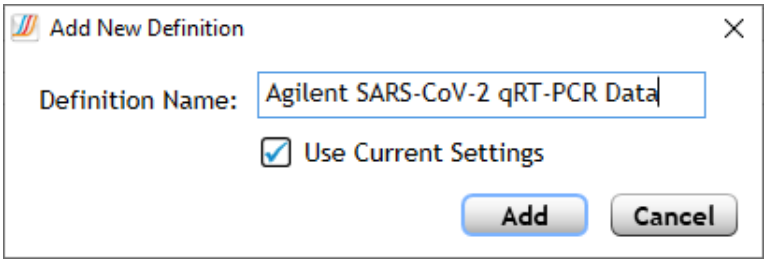


Abbildung 26 Aria-Dialogfeld „Add New Definition“ (Neue Definition hinzufügen)

Schritt 2. Exportieren der Daten

8 Vergewissern Sie sich im Fenster „Export Configuration“ (Exportkonfiguration), dass die Dropdown-Liste „Definition“ (Definition) auf **Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Data** eingestellt ist.

9 Klicken Sie auf **Export Data** (Daten exportieren).

Der Bericht wird in der Standardanwendung für den ausgewählten Dateityp geöffnet.

10 Überprüfen Sie die Cq-Daten für jede der Testproben und Kontrollen, um die Ergebnisse auszuwerten. Siehe Kapitel 6, „Analyse und Ergebnisse.“.

Durchführen der qRT-PCR auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

Dieser Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise zur Durchführung der qRT-PCR auf einem Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR Instrument.

Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem ABI 7500 Fast Real Time PCR Instrument

1. Stellen Sie sicher, dass das Gerät ABI 7500 Fast eingeschaltet ist.
2. Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC das Experiment, das Sie zuvor in der 7500-Software erstellt haben.
3. Drücken Sie am Gerät auf die Tür des Fachs, um den Deckel zu öffnen. Setzen Sie Ihre Reaktionsplatte in den Thermoblock des Geräts.
4. Drücken Sie auf die Tür des Fachs, um den Deckel zu schließen.
5. Klicken Sie auf dem PC auf **START RUN** (LAUF STARTEN).

   Das Gerät beginnt mit der Durchführung des Experiments.

Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das ABI 7500 Fast-Experiment

Schritt 1. Anzeigen der Amplifikations-Plots für alle Ziele in allen Wells

1. Öffnen Sie das Experiment nach Abschluss des Laufs in der Softwareanwendung Design & Analysis.
2. Klicken Sie oben auf dem Bildschirm auf die Registerkarte „Quality Check“ (Qualitätsprüfung), wenn sie nicht bereits ausgewählt ist. Stellen Sie sicher, dass in der Dropdown-Liste **Amplification Plot** (Amplifikations-Plot) ausgewählt ist.

   Auf dem Bildschirm werden die Amplifikations-Plots, eine Tabelle mit den Ergebnissen in jedem Well und ein Diagramm der Plattenkarte angezeigt.

HINWEIS Wenn die Platte leere Wells enthält, schließen Sie alle Ziele für diese Wells aus der Analyse aus und führen Sie eine erneute Analyse durch.

3. Klicken Sie auf **Actions** (Aktionen) **> Primary Analysis Setting** (Primäranalyseeinstellung).

   Das Dialogfeld „Primary Analysis Settings“ (Primäranalyseeinstellungen) wird geöffnet. Die Standardeinstellungen für dieses Dialogfeld finden Sie in **Abbildung 27**.
4. Vergewissern Sie sich, dass die Einstellungen mit den Werten in **Abbildung 27** übereinstimmen. Klicken Sie bei Bedarf auf **Reset to Default** (Auf Standard zurücksetzen).

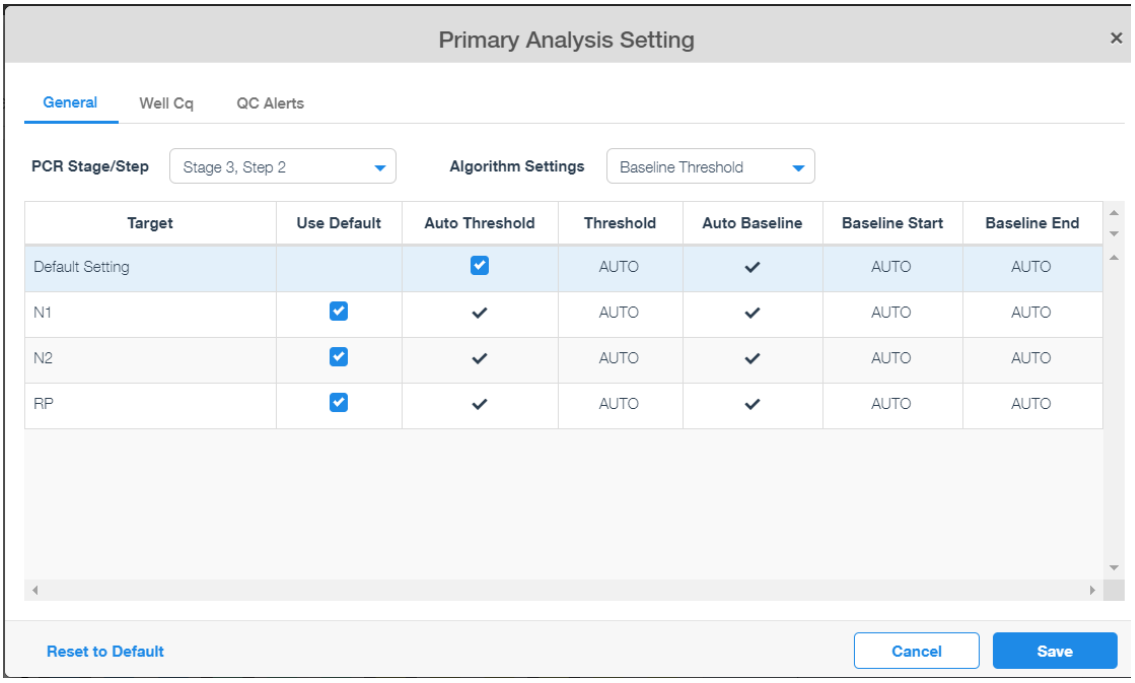


Abbildung 27 Standardeinstellungen im Design & Analysis-Dialogfeld „Primary Analysis Setting" (Primäranalyseeinstellung)

5 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld „Primary Analysis Setting" (Primäranalyseeinstellung) wird geschlossen.

6 Achten Sie darauf, dass die Schaltfläche „Analyze" (Analysieren) in der Ecke ein grünes Häkchen aufweist. Ist dies nicht der Fall, klicken Sie auf **Analyze** (Analysieren).

7 Prüfen Sie, ob Amplifikations-Plots mit einer frühen Amplifikation vorhanden sind (d. h. vor Zyklus 9). Schließen Sie alle Testproben mit früher Amplifikation von der Analyse aus und führen Sie einen erneuten Test mit einer niedrigeren Konzentration durch.

In Testproben mit ungewöhnlich hohen Konzentrationen viraler RNA kann die Amplifikation der viralen Ziele bereits bei einer sehr frühen Zyklusanzahl (< 9) nachweisbare Werte erreichen. Als Teil der Basislinienkorrekturberechnungen kann die Software solche frühen Amplifikationssignale als Hintergrundrauschen interpretieren, sodass den viralen Zielen in diesen Proben kein Cq-Wert zugewiesen wird.

Prüfen Sie das Vorhandensein derartiger Testproben, indem Sie die Amplifikations-Plots ohne Basislinienkorrektur (durch Festlegen von **Y Value** (Y-Wert) auf **Rn** (Rn)) anzeigen. Wenn eine der Testproben vor Zyklus 9 Anzeichen einer Amplifikation zeigt, entfernen Sie diese Wells aus der Analyse, indem Sie sie auf dem Bildschirm „Quality Check" (Qualitätsprüfung) ausschließen. Führen Sie die qRT-PCR-Reaktion für die Probe erneut durch, indem Sie die Nukleinsäure in einem 1:100-Verhältnis mit dem entsprechenden Elutionspuffer verdünnen.

Schritt 2. Bewerten der Schwellenwerte

8 Klicken Sie auf das Symbol „Settings" (Einstellungen) direkt über dem Diagramm „Amplification Plot" (Amplifikations-Plot).

Das Dialogfeld „Settings" (Einstellungen) wird auf der Registerkarte „General" (Allgemein) geöffnet.

9 Stellen Sie sicher, dass „Y Value“ (Y-Wert) auf **ΔRn** eingestellt ist.

10 Schalten Sie in der Dropdown-Liste „Y Scale“ (Y-Skala) die Auswahl von **Linear** (Linear) auf **Log** (Log) um, wie in **Abbildung 28** gezeigt.

Die Darstellung der Amplifikations-Plots in logarithmischen Werten ermöglicht eine bessere Ansicht des Hintergrundsignalrauschens. Siehe Beispiel in **Abbildung 29**. Die Schwellenwertlinie für jedes Ziel wird als horizontale Gerade dargestellt.

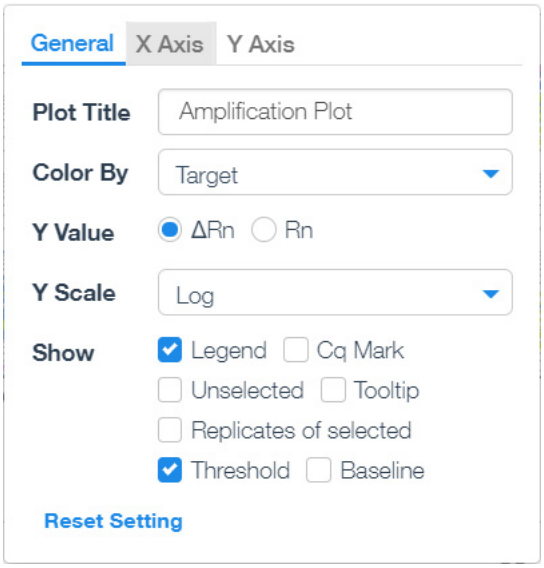


Abbildung 28 Design & Analysis-Bildschirm „General Settings“ (Allgemeine Einstellungen) für „Amplification Plot“ (Amplifikations-Plot)

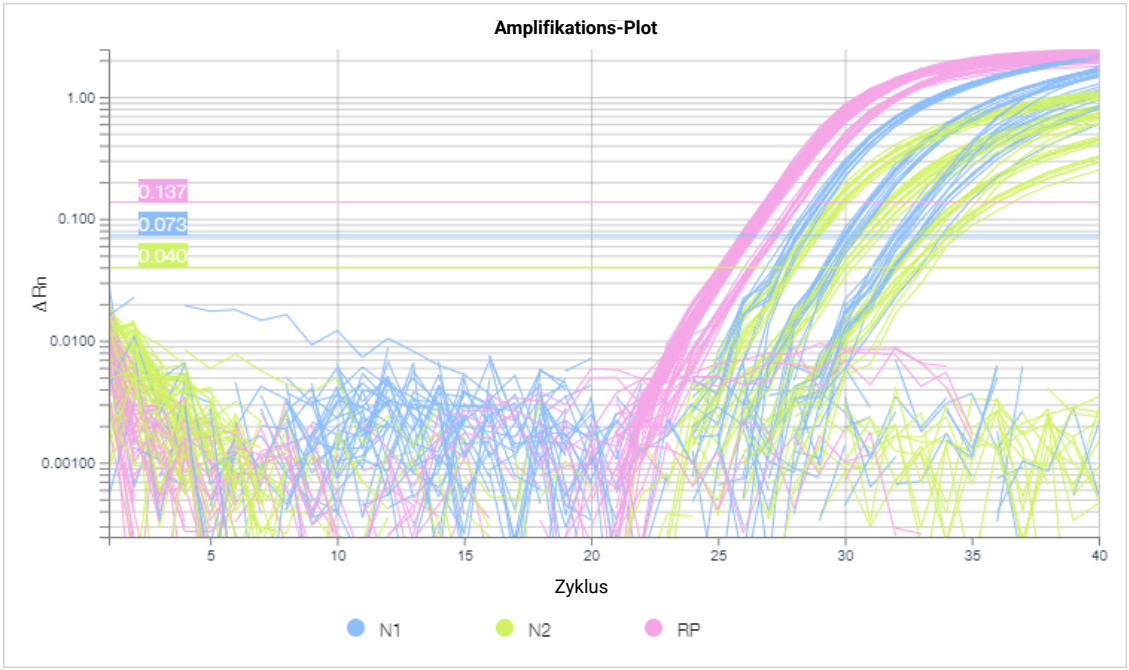


Abbildung 29 Design & Analysis-Bildschirm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) in logarithmischer Skala – Zielschwellenwerte werden als horizontale Geraden dargestellt

11 Führen Sie eine optische Bewertung der Amplifikations-Plots und der Standardschwellenwerte für das N1-Ziel aus.

a Erweitern Sie auf der linken Seite des Bildschirms die Dropdown-Liste „Targets“ (Ziele).

b Wählen Sie nur das N1-Ziel aus und klappen Sie dann die Dropdown-Liste aus.

c Bestimmen Sie, ob der Schwellenwert sowohl hoch genug ist, um über dem Hintergrundrauschen zu liegen, als auch niedrig genug, um die Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase einzubeziehen (siehe **Abbildung 30**). Gehen Sie auf der Grundlage dieser Bestimmung wie in **Tabelle 14** beschrieben vor.

12 Wiederholen Sie **Schritt 11** für das N2-Ziel und erneut für das RP-Ziel.

13 Klicken Sie auf der linken Seite des Bildschirms unter **Targets** (Ziele) auf **Clear all** (Alle löschen), um das Filtern nach Ziel zu entfernen.

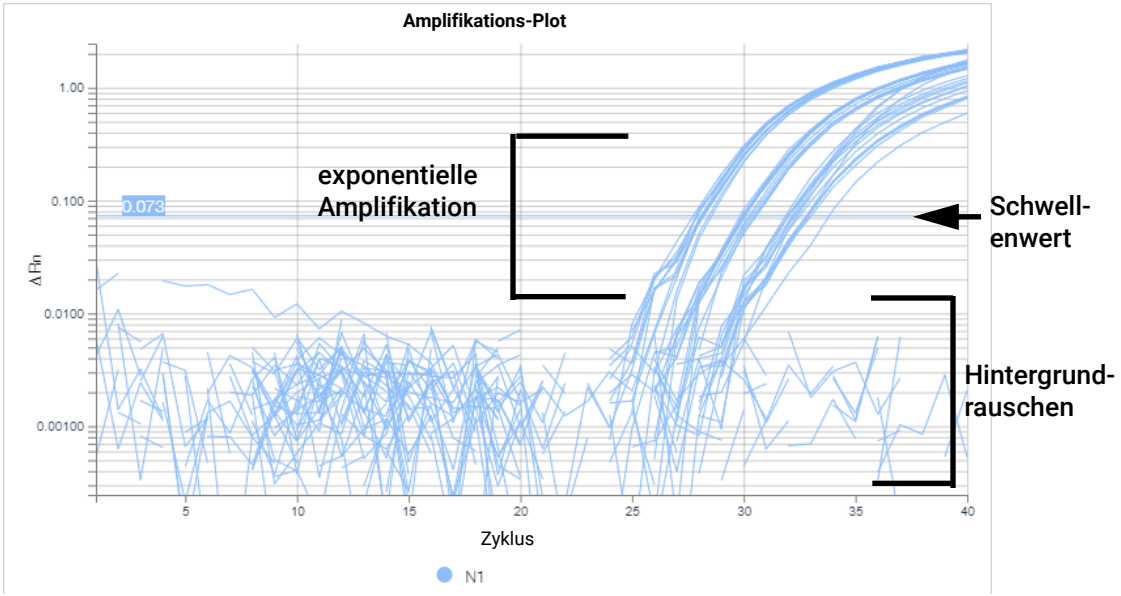


Abbildung 30 Design & Analysis-Bildschirm „Amplification Plots“ (Amplifikations-Plots) für das N1-Ziel

Tabelle 14 Überprüfen der optimalen Schwellenwerteinstellung in der Design & Analysis-Software

Position des Schwellenwerts	Beschreibung	Aktion
Optimale Position	Über dem Hintergrundrauschen und umfasst alle Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase	• Belassen Sie die Schwellenwerte auf ihren aktuellen Werten.
Zu hoch	Einige Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase übersteigen den Schwellenwert nicht	• Suchen Sie nach Wells mit außergewöhnlich hohem Hintergrundrauschen. Diese Ausreißer-Wells können dazu führen, dass die Software den Schwellenwert zu hoch ansetzt. • Wählen Sie das Ausreißer-Well auf der Plattenkarte aus. • Klicken Sie auf der Symbolleiste direkt über der Plattenkarte auf die Schaltfläche mit den drei Punkten. Klicken Sie in dem sich öffnenden Menü auf **Omit Wells** (Wells ausschließen). • Klicken Sie auf **Analyze** (Analysieren). Die Software berechnet den Schwellenwert neu, sobald das Ausreißer-Well ausgeschlossen wurde. Alternativ können Sie die Schwellenwertgerade im Diagramm mit der Maus manuell an eine neue Position ziehen. • Wählen Sie alle Wells auf der Plattenkarte aus, um alle Amplifikations-Plots anzuzeigen. Vergewissern Sie sich, dass der neue Schwellenwert in einer optimalen Position liegt. • Klicken Sie erneut auf die Schaltfläche mit den drei Punkten. Klicken Sie in dem sich öffnenden Menü auf **Unomit Wells** (Ausschluss der Wells aufheben), um das Ausreißer-Well wieder in die Analyse einzubeziehen.* * Wenn der Amplifikations-Plot für das Ausreißer-Well bei keiner Zykluszahl eine exponentielle Amplifikation zeigt, stellen Sie sicher, dass der abgesenkte Schwellenwert nicht dazu führt, dass die Software dem Well einen Cq-Wert zuweist (aufgrund von Hintergrundsignalrauschen, das den Schwellenwert übersteigt). Wenn dies der Fall ist, versuchen Sie, weitere Analyseeinstellungen für dieses Well zu ändern, z. B. durch Anpassung der Zyklusanzahl für „Baseline Start“ (Start der Basislinie) und/oder „Baseline End“ (Ende der Basislinie).
Zu niedrig	Einige Plots liegen nicht über dem Hintergrundrauschen.	• Erhöhen Sie den Schwellenwert bis knapp über den Hintergrundrauschpegel.

Schritt 3. Überprüfen der Ergebnisse im NTC-Well

14 Suchen Sie in der Tabelle „Well“ (Well) die Reaktion der Kontrolle ohne Vorlage (NTC), die sich in Well A12 befindet.

15 Stellen Sie sicher, dass die Cq-Spalte für alle drei Ziele „Undetermined“ (Nicht bestimmt) anzeigt oder einen Cq-Wert > 37,00 aufweist.

Wenn die NTC-Reaktion einen Cq-Wert ≤ 37,00 für eines der Ziele aufweist, deutet dies möglicherweise auf eine Probenkontamination hin. Erklären Sie den Lauf für ungültig und wiederholen Sie den Assay unter strikter Einhaltung der Richtlinien.

Exportieren der Well-Tabellendaten aus der Design & Analysis-Software in eine CSV-Datei

Schritt 1. Anpassen der unter „Well Table“ (Well-Tabelle) enthaltenen Spalten

1 Klicken Sie auf der Symbolleiste direkt über „Well Table“ (Well-Tabelle) auf **View** (Ansicht).

Es öffnet sich ein Menü, wie in **Abbildung 31** gezeigt, das alle verfügbaren Tabellenspalten auflistet.

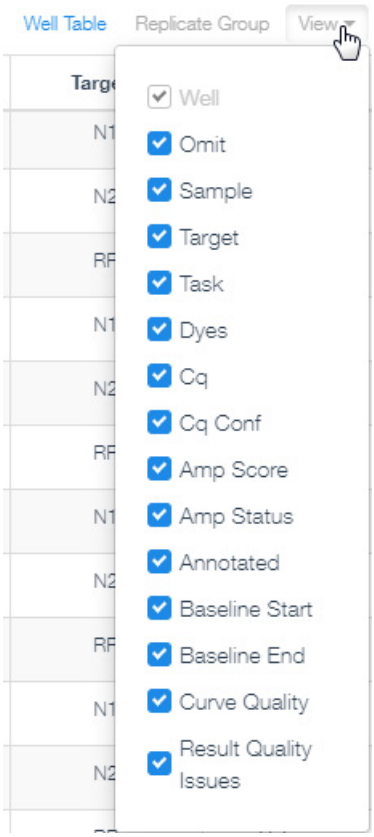
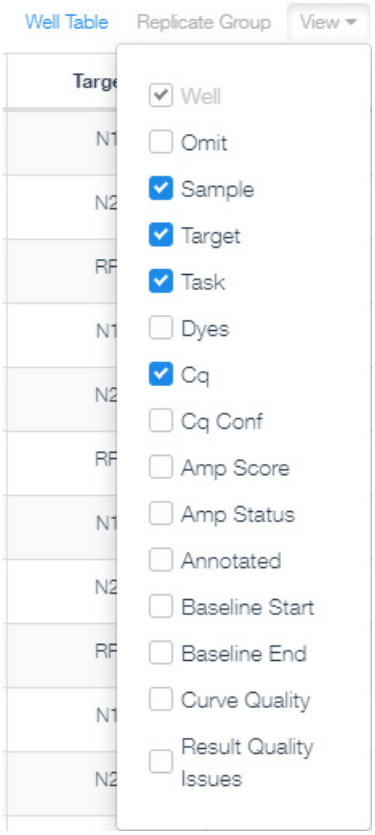


Abbildung 31 Menü „View“ (Ansicht) für „Well Table“ (Well-Tabelle) in Design & Analysis – Standardspaltenauswahl

2 Passen Sie die Einstellungen so an, dass nur die Spalten „Well“ (Well), „Sample“ (Probe), „Target“ (Ziel), „Task“(Aufgabe) und „Cq“ (Cq) markiert sind. Siehe **Abbildung 32**.



Markierte Spalten:

„Sample“ (Probe)

„Target“ (Ziel)

„Task“ (Aufgabe)

„Cq“ (Cq)

Abbildung 32 Menü „View“ (Ansicht) für „Well Table“ (Well-Tabelle) in Design & Analysis – benutzerdefinierte Spaltenauswahl

3 Klicken Sie auf **View** (Ansicht), um das Menü auszublenden.

Schritt 2. Exportieren der Daten

4 Klicken Sie auf der Symbolleiste direkt über „Well Table“ (Well-Tabelle) auf die Schaltfläche mit den drei Punkten. •••

5 Klicken Sie in dem sich öffnenden Menü auf **Export** (Exportieren).

Es öffnet sich ein Dialogfeld zum Speichern der CSV-Datei.

6 Wählen Sie einen Ordner für die Datei aus.

7 Geben Sie im Feld „File name“ (Dateiname) einen Namen für die Datei ein.

8 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen. Das Programm exportiert die Daten in den Dateityp CSV und speichert sie im angegebenen Ordner.

9 Öffnen Sie die Datei und überprüfen Sie die Cq-Daten für jede der Testproben und Kontrollen, um die Ergebnisse auszuwerten. Siehe **Kapitel 6**, „Analyse und Ergebnisse.“.

Durchführen der qRT-PCR auf dem Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Dieser Abschnitt beschreibt die Vorgehensweise zur Durchführung der qRT-PCR auf einem Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

Durchführen des qRT-PCR-Programms auf dem CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

1. Stellen Sie sicher, dass das Gerät CFX96 Touch eingeschaltet ist.
2. Öffnen Sie auf dem mit dem Gerät verbundenen PC das Experiment, das Sie zuvor in der Softwareanwendung CFX Maestro erstellt haben.
3. Navigieren Sie zur Registerkarte „Start Run“ (Lauf starten) auf dem Bildschirm „Run Setup“ (Laufeinrichtung).

   Wenn das Gerät eingeschaltet ist, aber nicht unter **Block Name** (Blockname) angezeigt wird, klicken Sie auf **Detect Instrument(s)** (Gerät(e) finden) in der oberen linken Ecke des Bildschirms.
4. Wählen Sie in der Tabelle das Gerät aus, mit dem Sie das Experiment durchführen möchten.
5. Klicken Sie auf **Open Lid** (Deckel öffnen).

   Der Deckel des Geräts wird geöffnet.
6. Setzen Sie Ihre Reaktionsplatte in den Thermoblock des Geräts.
7. Klicken Sie auf dem PC auf **Close Lid** (Deckel schließen).

   Der Deckel des Geräts wird geschlossen.
8. Klicken Sie auf **Start Run** (Lauf starten).
9. Speichern Sie die Laufdatei im gewünschten Ordner. Geben Sie einen Dateinamen ein und klicken Sie auf **Save** (Speichern).

   Das Gerät beginnt mit der Durchführung des Experiments.

Zuweisen von Datenanalyseeinstellungen für das CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System

Schritt 1. Anzeigen der Amplifikations-Plots für alle Ziele in allen Wells

1. Öffnen Sie das Experiment nach Abschluss des Laufs in der Softwareanwendung CFX Maestro.

   Das Experiment wird im Fenster „Data Analysis“ (Datenanalyse) geöffnet.
2. Klicken Sie oben im Fenster auf die Registerkarte „Quantification“ (Quantifizierung), wenn sie nicht bereits ausgewählt ist.

Im Fenster werden die Amplifikations-Plots, eine Tabelle mit den Ergebnissen in jedem Well und ein Diagramm der Plattenkarte angezeigt.

3 Wenden Sie die Funktion „Fluorescence Drift Correction“ (Korrektur der Fluoreszenzabweichung) an.

- Klicken Sie oben im Fenster „Data Analysis“ (Datenanalyse) auf **Settings** (Einstellungen) **> Baseline Settings** (Basislinieneinstellungen) **> Apply Fluorescence Drift Correction** (Korrektur der Fluoreszenzabweichung anwenden).

  Die Software korrigiert automatisch eine eventuell vorhandene Abweichung des Fluoreszenzsignals im Basislinien-Zyklusbereich.

4 Prüfen Sie, ob Amplifikations-Plots mit einer frühen Amplifikation vorhanden sind (d. h. vor Zyklus 9). Schließen Sie alle Testproben mit früher Amplifikation von der Analyse aus und führen Sie einen erneuten Test mit einer niedrigeren Konzentration durch.

In Testproben mit ungewöhnlich hohen Konzentrationen viraler RNA kann die Amplifikation der viralen Ziele bereits bei einer sehr frühen Zyklusanzahl (< 9) nachweisbare Werte erreichen. Als Teil der Basislinienkorrekturberechnungen kann die Software solche frühen Amplifikationssignale als Hintergrundrauschen interpretieren, sodass den viralen Zielen in diesen Proben kein Cq-Wert zugewiesen wird.

Prüfen Sie das Vorhandensein derartiger Testproben, indem Sie die Amplifikations-Plots ohne Basislinienkorrektur (durch Festlegen von **Baseline Setting** (Basislinieneinstellung) auf **No Baseline Subtraction** (Keine Basisliniensubtraktion)) anzeigen. Wenn eine der Testproben vor Zyklus 9 Anzeichen einer Amplifikation zeigt, entfernen Sie diese Wells im Fenster „Plate Editor“ (Platten-Editor) aus der Analyse. Führen Sie die qRT-PCR-Reaktion für die Probe erneut durch, indem Sie die Nukleinsäure in einem 1:100-Verhältnis mit dem entsprechenden Elutionspuffer verdünnen.

Schritt 2. Bewerten der Schwellenwerte

5 Überprüfen Sie die Auswahl unter **Settings** (Einstellungen) **> Baseline Setting** (Basislinieneinstellung), um sicherzustellen, dass sie auf **Baseline Subtracted Curve Fit** (Kurvenanpassung durch Basisliniensubtraktion) eingestellt ist.

6 Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das Diagramm „Amplification“ (Amplifikation) und wählen Sie **Show Threshold Values** (Schwellenwerte anzeigen) aus (falls nicht bereits markiert).

Die Schwellenwertlinie für jedes Ziel wird als horizontale Gerade dargestellt.

7 Markieren Sie in der unteren rechten Ecke des Diagramms „Amplification“ (Amplifikation) das Kontrollkästchen „Log“ (Log).

Die Darstellung der Amplifikations-Plots in logarithmischen Werten ermöglicht eine bessere Ansicht des Hintergrundsignalrauschens.

8 Setzen Sie den Minimalwert für die Y-Achse auf 0,0.

a Klicken Sie rechts neben dem Diagramm „Amplification“ (Amplifikation) auf das Symbol für die Diagrammeinstellungen.

Das Dialogfeld „Chart Settings“ (Diagrammeinstellungen) wird geöffnet.

b Klicken Sie auf die Registerkarte „Axes Scale“ (Achsenskala).

c Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen „Auto Scale“ (Automatische Skalierung).

d Geben Sie in der Spalte **Min** (Min.) für **Y-Axis (log 10)** (Y-Achse (log 10)) **0,0** ein, wie in **Abbildung 33** gezeigt.

e Klicken Sie auf **OK** (OK).

Das Dialogfeld wird geschlossen und die Skala der Y-Achse beginnt bei 0,0, sodass das Signalrauschen in den Diagrammen angezeigt werden kann. Siehe Beispiel in **Abbildung 34**.

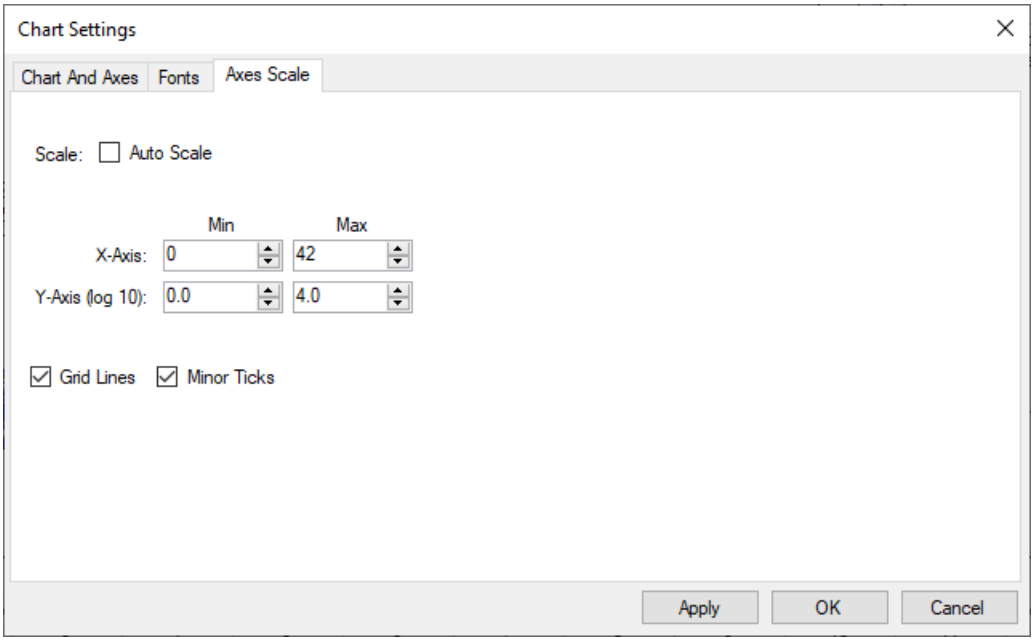


Abbildung 33 Maestro-Dialogfeld „Chart Settings“ (Diagrammeinstellungen) – Registerkarte „Axes Scale“ (Achsenskala)

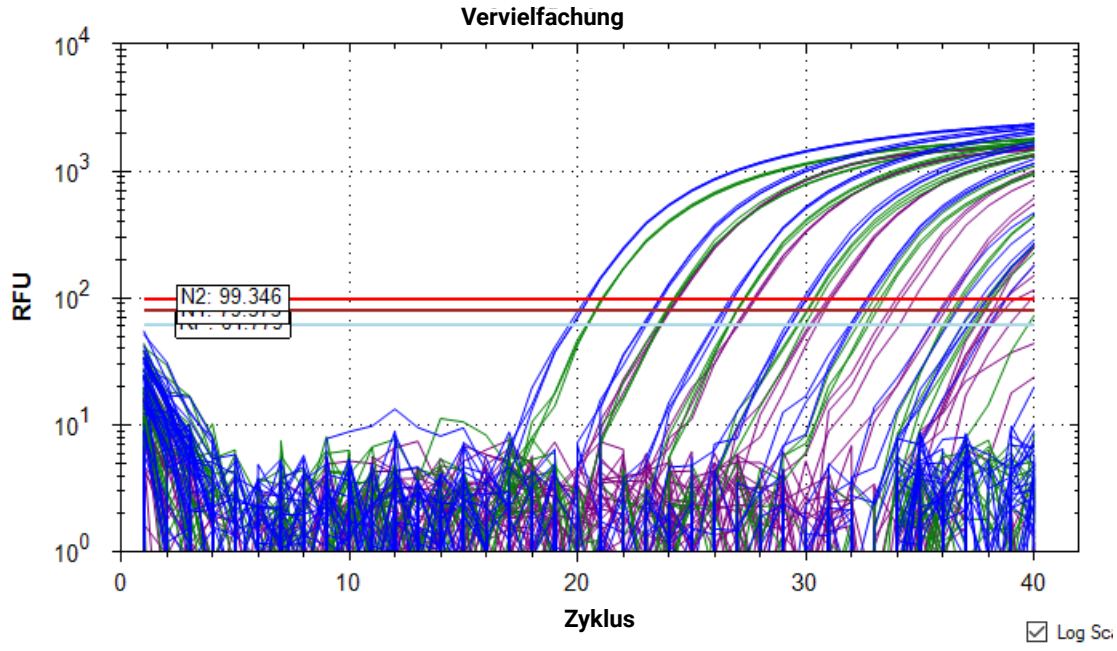


Abbildung 34 Maestro-Diagramm „Amplification“ (Amplifikation) in logarithmischer Skala – Zielschwellenwerte werden als horizontale Geraden dargestellt

9 Führen Sie eine optische Bewertung der Amplifikations-Plots und der Standardschwellenwerte für das N1-Ziel aus.

   a Wählen Sie unterhalb des Diagramms „Amplification“ (Amplifikation) mithilfe der Kontrollkästchen nur das Ziel FAM (N1) zur Anzeige aus.

   b Bestimmen Sie, ob der Schwellenwert sowohl hoch genug ist, um über dem Hintergrundrauschen zu liegen, als auch niedrig genug, um die Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase einzubeziehen (siehe **Abbildung 35**). Gehen Sie auf der Grundlage dieser Bestimmung wie in **Tabelle 15** beschrieben vor.

10 Wiederholen Sie **Schritt 11** für das N2-Ziel und erneut für das RP-Ziel.

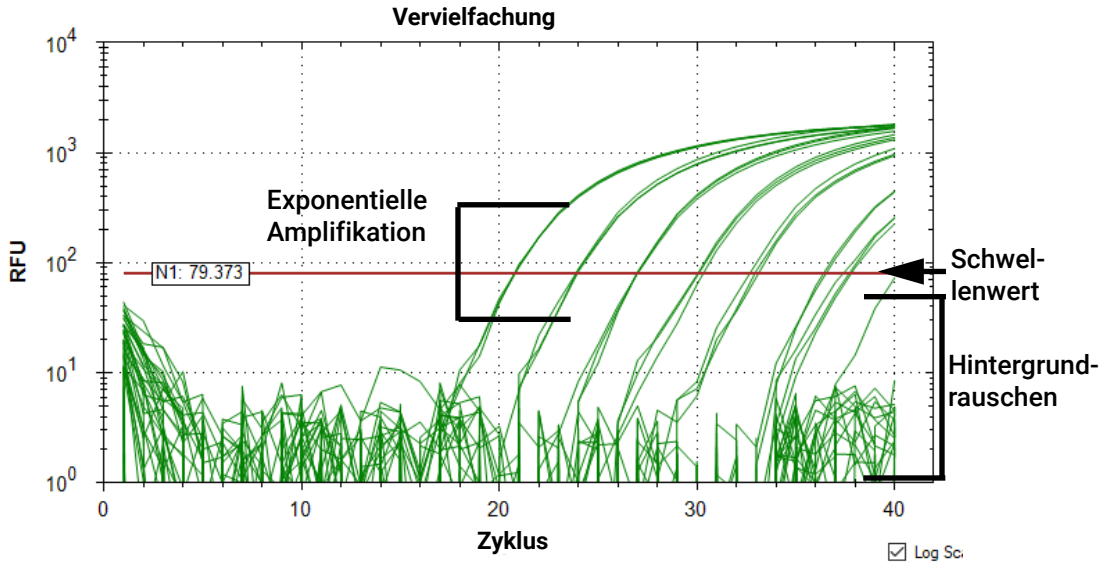


Abbildung 35 Maestro-Diagramm „Amplification“ (Amplifikation) für das N1-Ziel

Tabelle 15 Überprüfen der optimalen Schwellenwerteinstellung in der Design & Analysis-Software

Position des Schwellenwerts	Beschreibung	Aktion
Optimale Position	Über dem Hintergrundrauschen und umfasst alle Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase	• Belassen Sie die Schwellenwerte auf ihren aktuellen Werten.
Zu hoch	Einige Plots in der exponentiellen Amplifikationsphase übersteigen den Schwellenwert nicht	• Suchen Sie nach Wells mit außergewöhnlich hohem Hintergrundrauschen. Diese Ausreißer-Wells können dazu führen, dass die Software den Schwellenwert zu hoch ansetzt. • Klicken Sie auf **Plate Setup** (Platteneinrichtung) **> View/Edit Plate** (Platte anzeigen/bearbeiten), um die Option „Plate Editor" (Platten-Editor) zu öffnen. • Wählen Sie das Ausreißer-Well auf der Plattenkarte aus. • Markieren Sie auf der Leiste auf der rechten Seite des Bildschirms „Plate Editor" (Platten-Editor) das Kontrollkästchen **Exclude Wells in Analysis** (Wells aus der Analyse ausschließen) (im unteren Bereich der Leiste). • Klicken Sie auf **OK** (OK). Wenn Sie gefragt werden, ob Sie die Änderungen übernehmen möchten, klicken Sie auf **Yes** (Ja). Die Software berechnet den Schwellenwert neu, sobald das Ausreißer-Well ausgeschlossen wurde. Alternativ können Sie die Schwellenwertgerade im Diagramm mit der Maus manuell an eine neue Position ziehen. • Klicken Sie auf der rechten Seite des Diagramms „Amplification" (Amplifikation) auf das Symbol für den Basislinienschwellwert, um das Dialogfeld „Baseline Threshold" (Basislinienschwellwert) zu öffnen. • Ändern Sie unter **Single Threshold** (Einzelner Schwellenwert) die Auswahl von **Auto Calculated** (Automatische Berechnung) zu **User Defined** (Benutzerdefiniert). (Dadurch wird verhindert, dass die Software den Schwellenwert neu berechnet, sobald das Ausreißer-Well wieder einbezogen wird.) Klicken Sie auf **OK** (OK), um das Dialogfeld zu schließen. • Klicken Sie auf **Plate Setup** (Platteneinrichtung) **> View/Edit Plate** (Platte anzeigen/bearbeiten), um die Option „Plate Editor" (Platten-Editor) erneut zu öffnen. Wählen Sie das Ausreißer-Well aus und deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Exclude Wells in Analysis** (Wells aus der Analyse ausschließen). Klicken Sie auf **OK** (OK) und dann auf **Yes** (Ja). • Wählen Sie auf der Plattenkarte unter dem Diagramm „Amplification" (Amplifikation) alle Wells aus, um die Ausreißer-Wells wieder in die Analyse einzubeziehen.* * Wenn der Amplifikations-Plot für das Ausreißer-Well bei keiner Zykluszahl eine exponentielle Amplifikation zeigt, stellen Sie sicher, dass der abgesenkte Schwellenwert nicht dazu führt, dass die Software dem Well einen Cq-Wert zuweist (aufgrund von Hintergrundsignalrauschen, das den Schwellenwert übersteigt). Wenn dies der Fall ist, versuchen Sie, weitere Analyseeinstellungen für dieses Well zu ändern, z. B. durch Anpassung der Zyklusanzahl für „Baseline Begin" (Beginn der Basislinie) und/oder „Baseline End" (Ende der Basislinie).
Zu niedrig	Einige Plots liegen nicht über dem Hintergrundrauschen.	• Erhöhen Sie den Schwellenwert bis knapp über den Hintergrundrauschpegel.

Schritt 3. Überprüfen der Ergebnisse im NTC-Well

11 Suchen Sie in der Ergebnistabelle die Reaktion der Kontrolle ohne Vorlage (NTC), die sich in Well A12 befindet.

12 Stellen Sie sicher, dass die Cq-Spalte für alle drei Ziele „N/A“ (k. A.) anzeigt oder einen Cq-Wert > 37,00 aufweist.

Wenn die NTC-Reaktion einen Cq-Wert ≤ 37,00 für eines der Ziele aufweist, deutet dies möglicherweise auf eine Probenkontamination hin. Erklären Sie den Lauf für ungültig und wiederholen Sie den Assay unter strikter Einhaltung der Richtlinien.

Exportieren der Daten aus der CFX Maestro-Software

1 Klicken Sie oben im Fenster „Data Analysis“ (Datenanalyse) auf **Export** (Exportieren) **> Custom Export** (Benutzerdefinierter Export).

Das Dialogfeld „Custom Export“ (Benutzerdefinierter Export) wird geöffnet.

2 Wählen Sie im Dialogfeld „Export Format“ (Exportformat) einen Dateityp für die exportierten Daten aus, z. B. **Excel 2007 (*.xlsx)** (Excel 2007 (*.xlsx)).

Stellen Sie sicher, dass Ihr PC über die notwendige Software zum Öffnen des gewählten Dateityps verfügt.

3 Markieren Sie im Dialogfeld die Kontrollkästchen wie in **Abbildung 36** gezeigt. Überprüfen Sie den Abschnitt „Exported Columns“ (Exportierte Spalten), um sicherzustellen, dass dort die Optionen **Well** (Well), **Target Name** (Zielname), **Sample Name** (Probenname) und **Cq** (Cq) aufgeführt sind.

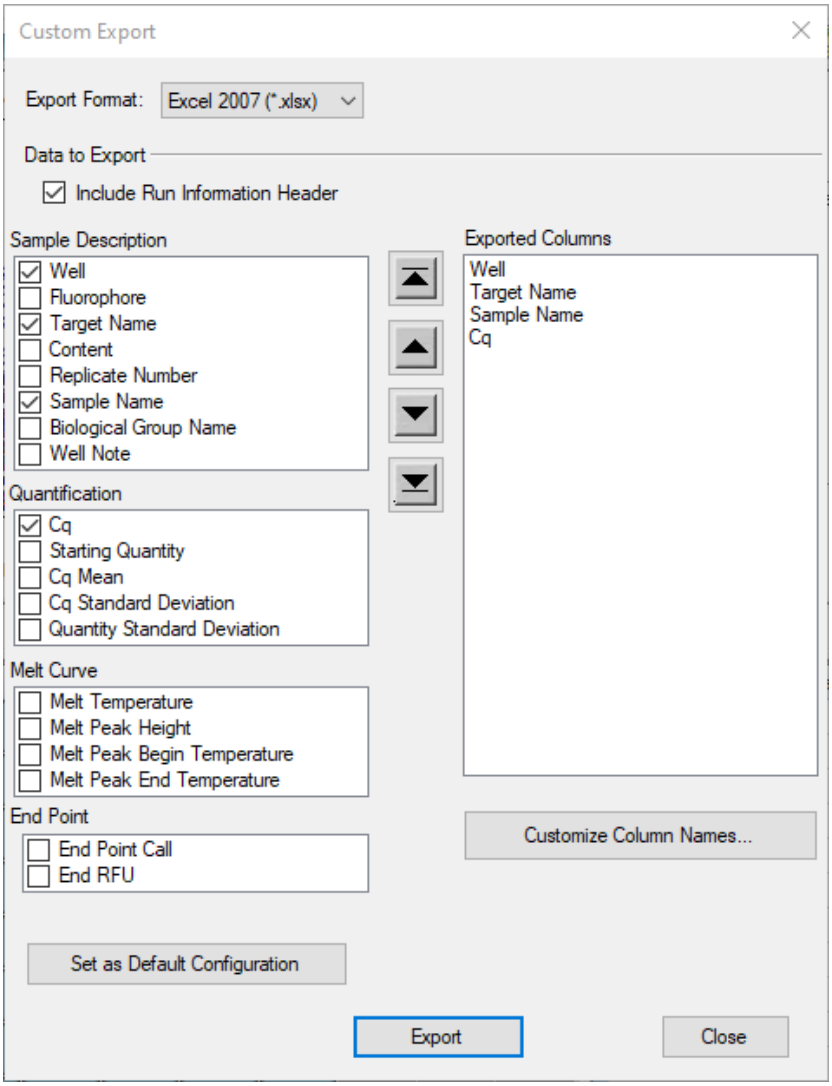


Abbildung 36 Benutzerdefinierte Datenexporteinstellungen für die CFX Maestro-Anwendung

4 Klicken Sie auf **Export** (Exportieren).

Das Dialogfeld „Save As“ (Speichern unter) wird geöffnet.

5 Wählen Sie einen Ordner für die Datei aus.

6 Geben Sie in das Feld „File name“ (Dateiname) einen Namen für die Datei ein oder verwenden Sie die Vorgabe.

7 Klicken Sie auf **Save** (Speichern).

Das Dialogfeld wird geschlossen. Das Programm exportiert die Daten in den ausgewählten Dateityp und speichert sie im angegebenen Ordner.

8 Öffnen Sie die Datei und überprüfen Sie die Cq-Daten für jede der Testproben und Kontrollen, um die Ergebnisse auszuwerten. Siehe Kapitel 6, „Analyse und Ergebnisse.“.

6 Analyse und Ergebnisse

Auswertung der Ergebnisse **71**

Das Kapitel enthält Informationen zur Auswertung der Assay-Ergebnisse auf Basis der qRT-PCR-Daten.

Auswertung der Ergebnisse

Ergebnisse und Auswertung für Kontrollproben

Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Leistung zeigt, wie in **Tabelle 16** beschrieben, wurde der Assay möglicherweise nicht ordnungsgemäß eingerichtet oder durchgeführt oder es ist eine Fehlfunktion der Reagenzien oder Geräte aufgetreten. Erklären Sie den Lauf in einem solchen Fall als ungültig und wiederholen Sie den Assay.

Kontrolle ohne Vorlage (NTC)

Bei der NTC wird für die qRT-PCR-Reaktion nucleasefreies Wasser anstelle von RNA verwendet. Die NTC-Reaktion sollte für keines der drei Ziele Fluoreszenz-Wachstumskurven aufweisen, die die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen überschreiten. Zeigt die NTC-Reaktion eine Wachstumskurve mit einem Cq-Wert ≤ 37,00, kam es möglicherweise zu einer Probenkontamination. Erklären Sie den Lauf für ungültig und wiederholen Sie den Assay unter strikter Einhaltung der Richtlinien.

SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx

Die qRT-PCR-Reaktion für die SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx liefert ein positives Ergebnis für die Ziele 2019-nCoV_N1 und 2019-nCoV_N2 mit einem Cq-Wert kleiner oder gleich 37,00, während sie für das humane RNase P-Genziel ein negatives Ergebnis liefert (angegeben als „No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00).

Humanprobenkontrolle

Die Humanprobenkontrolle besteht aus nicht-infektiösen Humanzellen und wird als Verfahrenskontrolle für die RNA-Extraktion verwendet, um die erfolgreiche RNA-Extraktion und die Integrität des Extraktionsreagenzes zu demonstrieren. Die qRT-PCR-Reaktion für die aus der Humanprobenkontrolle extrahierte RNA sollte ein positives Ergebnis für das RP-Ziel mit einem Cq-Wert kleiner oder gleich 37,00 liefern. Die N1- und N2-SARS-CoV-2-Ziele sollten negative Ergebnisse liefern (angegeben als „No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00).

Tabelle 16 Erwartete Leistung der Kontrollen

Typ der Kontrolle	Name der Kontrolle	Überwachung von	Ergebnis des N1-Ziels	Ergebnis des N2-Ziels	Ergebnis des RP-Ziels
Positiv	SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control Dx	Erheblicher Reagenzienausfall einschließlich Primer- und Sondenintegrität	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)

Tabelle 16 Erwartete Leistung der Kontrollen (continued)

Typ der Kontrolle	Name der Kontrolle	Überwachung von	Ergebnis des N1-Ziels	Ergebnis des N2-Ziels	Ergebnis des RP-Ziels
Negativ	NTC	Kontamination durch Reagenzien und/oder Umgebung	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)
Extraktion	Humanprobenkontrolle	Fehler im Lyse- und Extraktionsverfahren, mögliche Kontamination während der Extraktion	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)

Ergebnisse und Auswertung für klinische Proben

Tabelle 17 führt die erwarteten Ergebnisse für den Assay auf. Wenn Ihr Labor unerwartete Ergebnisse für die Assay-Kontrollen erhält oder wenn nicht schlüssige oder ungültige Ergebnisse erhalten werden und diese nicht durch die empfohlenen erneuten Tests behoben werden können, wenden Sie sich bitte an die CDC zur Beratung und eventuellen Weiterleitung von Proben.

Humanes RNase P (RP)-Genziel

Alle klinischen Proben sollten Fluoreszenz-Wachstumskurven für das RP-Ziel aufweisen, die die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (Cq ≤ 37,00) überschreiten, was auf das Vorhandensein des humanen RNase P-Gens hinweist. Wenn das RP-Ziel in klinischen Proben nicht nachgewiesen werden kann, kann dies ein Hinweis auf Folgendes sein:

- Unsachgemäße Extraktion von Nukleinsäure aus klinischem Material, die zum RNA-Verlust und/oder RNA-Abbau oder der Verschleppung von Inhibitorsubstanzen führt.
- Fehlen von ausreichendem humanem Zellmaterial aufgrund mangelhafter Entnahme oder Verlust der Probenintegrität.
- Unsachgemäße Einrichtung und Durchführung des Assays.
- Fehlfunktion der Reagenzien oder Geräte.

Wenn der RP-Assay bei klinischen Humanproben kein positives Ergebnis liefert, werten Sie dies wie folgt aus:

- Wenn die N1- und N2-Ziele positiv sind (Cq ≤ 37,00), auch wenn kein positiver RP-Wert vorliegt, dann ist das Ergebnis als gültig zu betrachten. Es ist möglich, dass einige Proben aufgrund geringer Zellzahlen in der ursprünglichen klinischen Probe oder aufgrund von viralen Zielen, die die RP-Amplifikationseffizienz reduzieren, keine RNase P-Wachstumskurven aufweisen, insbesondere bei Proben mit hoher Viruslast. Ein negatives RP-Signal schließt das Vorhandensein von RNA des SARS-CoV-2-Virus in einer klinischen Probe nicht aus.
- Wenn das RP-Ziel negativ ist (kein Cq-Wert nachgewiesen oder Cq > 37,00), während eines oder beide der N1- und N2-Ziele negativ ist/sind (kein Cq-Wert nachgewiesen oder Cq > 37,00), dann sollte das Ergebnis für die Probe als ungültig betrachtet werden. Wenn noch restliches Probenmaterial vorhanden ist, wiederholen Sie den Extraktionsvorgang und wiederholen Sie den Test. Wenn sämtliche Ziele nach dem erneuten Test immer noch negativ sind, melden Sie die Ergebnisse als ungültig. Es sollte nach Möglichkeit eine neue Probe entnommen werden.

2019-nCoV_N1- und 2019-nCoV_N2-Ziele

- Wenn alle Kontrollen die erwartete Leistung aufweisen, gilt eine Probe als **positiv** für SARS-CoV-2, wenn die folgende Bedingung erfüllt ist.
  - Die Wachstumskurven sowohl für das N1- als auch für das N2-Ziel schneiden die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (Cq ≤ 37,00). Das RP-Ziel kann positiv oder nicht positiv sein (siehe Beschreibung oben), wobei das SARS-CoV-2-Ergebnis weiterhin als gültig angesehen wird.
- Wenn alle Kontrollen die erwartete Leistung aufweisen, gilt eine Probe als **negativ** für SARS-CoV-2, wenn BEIDE der folgenden Bedingungen erfüllt sind.
  - Die Wachstumskurven für die N1- und N2-Ziele überschreiten NICHT die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (kein Cq-Wert nachgewiesen oder Cq > 37,00).
  - Die Wachstumskurve für das RP-Ziel ÜBERSCHREITET die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (Cq ≤ 37,00).
- Wenn alle Kontrollen die erwartete Leistung aufweisen, gilt eine Probe als **nicht schlüssig** für SARS-CoV-2, wenn EINE der folgenden Bedingungen erfüllt ist.
  - Die Wachstumskurve für eines der 2019-nCoV-Ziele überschreitet die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (Cq ≤ 37,00), während die Wachstumskurve für das andere 2019-nCoV-Ziel die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen nicht überschreitet (kein Cq-Wert nachgewiesen oder Cq > 37,00). Die Wachstumskurve für das RP-Ziel überschreitet die Schwellenwertgerade innerhalb von 37,00 Zyklen (Cq ≤ 37,00).

  Bei nicht schlüssigen Proben sollte die extrahierte RNA aus der Probe erneut getestet werden. Wenn keine Rest-RNA verfügbar ist, extrahieren Sie erneut RNA aus dem restlichen Probenmaterial und führen Sie den Test erneut durch. Wenn Sie das gleiche Ergebnis erhalten, melden Sie das Ergebnis als nicht schlüssig.
- Wenn die Humanprobenkontrolle positiv für N1 oder N2 ist (Cq ≤ 37,00), kam es während der Extraktion oder der Probenverarbeitung möglicherweise zu einer Kontamination. Erklären Sie alle Ergebnisse für Proben, die zusammen mit der Humanprobenkontrolle entnommen wurden, als ungültig. Entnehmen Sie die Proben und die Humanprobenkontrolle erneut und führen Sie den Test erneut durch.

Tabelle 17 Erwartete Ergebnisse für den SARS-CoV-2 qRT-PCR-Assay

2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N2	Humanes RNase P-Gen	Ergebnisauswer-tung*	Report (Bericht)	Aktionen
Positiv (Cq ≤ 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Positiv ODER negativ	SARS-CoV-2 nachgewiesen	Positiv für SARS-CoV-2	Ergebnisse an CDC und Absender melden.
Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	SARS-CoV-2 nicht nachgewiesen	Nicht nachgewiesen	Ergebnisse an Absender melden. Erwägen Sie einen Test auf andere Atemwegsviren.†
Negativ (Cq ≤ 37,00)	Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Nicht schlüssiges Ergebnis	Nicht schlüssig	Wiederholungstest der extrahierten Probe und/oder Wiederholung der Extraktion und qRT-PCR.
Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Positiv (Cq ≤ 37,00)	Nicht schlüssiges Ergebnis	Nicht schlüssig	Wiederholungstest der extrahierten Probe und/oder Wiederholung der Extraktion und qRT-PCR.
Wenn eines oder beide der 2019-nCov-Ziele negativ ist/sind (kein Cq-Wert nachgewiesen oder Cq > 37,00)		Negativ („No Cq detected“ (Kein Cq-Wert nachgewiesen) oder Cq > 37,00)	Ungültiges Ergebnis	Ungültig	Wiederholung der Extraktion und qRT-PCR. Wenn das Ergebnis der Wiederholung auch ungültig ist, erwägen Sie die neue Entnahme einer Patientenprobe.

* Labore sollten ihr Diagnoseergebnis in geeigneter Weise und in Übereinstimmung mit ihrem spezifischen Berichtssystem melden.

† Die optimalen Probentypen und der optimale Zeitpunkt für den Höchstwert der Viruskonzentration bei durch 2019-nCoV verursachten Infektionen wurden nicht ermittelt. Die Entnahme mehrerer Proben von demselben Patienten kann zum Nachweis des Virus erforderlich sein. Die Möglichkeit eines falsch-negativen Ergebnisses sollte insbesondere dann in Betracht gezogen werden, wenn die jüngsten Expositionen des Patienten oder sein klinischer Befund auf eine 2019-nCoV-Infektion hindeuten und Diagnosetests für andere Krankheitsursachen (z. B. andere Atemwegserkrankungen) negativ sind. Besteht weiterhin der Verdacht auf eine 2019-nCoV-Infektion, sollte in Absprache mit den Gesundheitsbehörden ein erneuter Test erwogen werden.

7 Qualitätskontrolle

Qualitätskontrolle **76**

Dieses Kapitel enthält Informationen zu den Qualitätskontrollmaßnahmen für den Assay.

Qualitätskontrolle

- Die Anforderungen der Qualitätskontrolle müssen in Übereinstimmung mit den Vorschriften von Gemeinden, Ländern und Bund oder den Akkreditierungsanforderungen und den Standard-Qualitätskontrollverfahren des Anwenderlabors durchgeführt werden.
- Die Qualitätskontrollverfahren dienen der Überwachung der Reagenzien- und Assay-Leistung.
- Testen Sie alle Positivkontrollen vor der Prüfung diagnostischer Proben mit einer neuen Kitcharge, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Kitkomponenten ordnungsgemäß funktionieren.
- Die gute Laborpraxis (cGLP) empfiehlt, eine positive Extraktionskontrolle in jede Nukleinsäure-Isolationscharge aufzunehmen.
- Die Humanprobenkontrolle **muss** die Nukleinsäureextraktion mit jeder Charge der zu testenden Proben durchlaufen.
- Nehmen Sie **immer** eine Kontrolle ohne Vorlage (NTC) und die SARS-CoV-2 Synthetic Positive RNA Control in jeden Amplifikations- und Nachweislauf auf.
- Das Sonden-/Primerset für das humane RNase P-Gen (enthalten im 10× SARS-CoV-2 Primer/Probe Mix) kontrolliert die Probenqualität und die Extraktion.

8 Beschränkungen des Assays

Beschränkungen **78**

Dieses Kapitel beschreibt die Beschränkungen des Assays, der mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit durchgeführt wird.

Beschränkungen

1. Die Verwendung dieses Assays ist auf Personal beschränkt, das in diesem Verfahren geschult ist. Die Nichtbeachtung dieser Anweisungen kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
2. Zuverlässige Ergebnisse hängen von einer ordnungsgemäßen Durchführung von Probenentnahme, -transport, -lagerung und -verarbeitung ab.
3. Vermeiden Sie Kontaminationen, indem Sie sich an die gute Laborpraxis und an die in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Verfahren halten.
4. Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Behandlungs- oder andere Managemententscheidungen verwendet werden.
5. Ein positives Ergebnis gilt als Nachweis von Nukleinsäure des entsprechenden Virus. Nukleinsäure kann auch dann noch vorhanden sein, wenn das Virus nicht mehr lebensfähig ist.
6. Die Leistung des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit-Assays wurde unter Verwendung von nasopharyngealen Abstrichproben ermittelt, die in UTM- oder VCM-Transportmedien gesammelt wurden. Oropharyngeale Abstriche, nasale Abstriche und nasale Abstriche aus der mittleren Nasenmuschel werden als zulässige Probenarten für die Verwendung mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit-Assay angesehen. Die Leistung wurde mit diesen Probenarten jedoch nicht nachgewiesen. Das Testen von oropharyngealen Abstrichen, nasalen Abstrichen und nasalen Abstrichen aus der mittleren Nasenmuschel (selbst entnommen unter Aufsicht eines Gesundheitsdienstleisters oder von diesem entnommen) ist auf Patienten mit COVID-19-Symptomen beschränkt.
7. Das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit enthält keine Probe zur Verwendung als Humanprobenkontrolle. Die als diese Kontrolle verwendete Probe muss vom Labor validiert werden.

9 Leistungsmerkmale

Leistungsmerkmale **80**

Dieses Kapitel enthält die Leistungsmerkmale des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits.

Leistungsmerkmale

Die folgenden Daten zeigen die Leistungsmerkmale des Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kits. Bei allen Probenextraktionen wurden die im Abschnitt **„Extraktion von Nukleinsäuren“** auf **Seite 19** empfohlenen Probeneingabe- und Elutionsvolumina verwendet.

Analytische Empfindlichkeit (Nachweisgrenze)

Agilent führte eine Studie zur Nachweisgrenze (LoD) durch, um die niedrigste SARS-CoV-2-Viruskonzentration (ausgedrückt als Anzahl der viralen Genomkopien) zu ermitteln, die mit jedem der unterstützten Nukleinsäure-Extraktionsverfahren auf jedem der drei unterstützten Echtzeit-PCR-Systeme zu mindestens 95 % der Zeit durch das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit nachgewiesen werden kann.

Die Probenfelder für den LoD-Test wurden durch Verdünnen eines im Handel erhältlichen, quantifizierten SARS-CoV-2-Standards mit gepoolten, negativen klinischen Proben (Negativmatrix) erstellt, um eine Reihe von gewünschten SARS-CoV-2-Zielkonzentrationen zu generieren. Bei allen klinischen Proben handelte es sich um nasopharyngeale Abstriche, die zuvor vom Lieferanten mittels eines SARS-CoV-2-Tests mit Notfallzulassung auf SARS-CoV-2 getestet und ferner von Agilent bestätigt wurden.

Beim vorläufigen LoD-Experiment für den gesamten Assay wurde eine Reihe von Viruskonzentrationen mit drei Replikaten pro Konzentration verwendet. Der Konzentrationsbereich im Vorversuch umfasste Konzentrationen von 0,75 bis 3 Kopien/µl. Die Ergebnisse des Vorversuchs deuteten darauf hin, dass die endgültige LoD wahrscheinlich innerhalb dieses Bereichs liegen und je nach Extraktionsmethode und Echtzeit-PCR-System variieren würde.

Das abschließende LoD-Bestätigungsexperiment für den gesamten Assay wurde mit drei Zieleingangsstufen durchgeführt: 0,75, 1, und 1,5 Kopien/µl. Für jede der drei Zieleingabestufen wurden 20 einzelne Extraktionsreplikate über alle möglichen Kombinationen von Extraktionsmethode und Echtzeit-PCR-System getestet. **Tabelle 18** zeigt die positiven Nachweisraten aus diesem Experiment. Eine Nachweisrate von 20/20 bedeutet, dass alle 20 Extraktionsreplikate mit dieser speziellen Kombination aus Extraktionsmethode und Echtzeit-PCR-System nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 18 Endgültige Bestätigung der Nachweisgrenze – Positive Nachweisraten* für die jeweilige Nukleinsäure-Extraktionsmethode auf dem jeweiligen Echtzeit-PCR-System (Agilent AriaMx, ABI 7500 und Bio-Rad CFX96)

Zieleingabestufen für das SARS-CoV-2-Virus vor der Extraktion (Kopien/µl)	QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit mit QIAsymphony (automatisierte Extraktion)			MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit mit KingFisher Flex (automatisierte Extraktion)		
	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
1,5	19/19 (1)	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20
1	1/10 (10)	20/20	17/18 (2)	19/19 (1)	18/19 (1)	18/18 (2)
0,75	3/13 (7)	15/16 (4)	18/18 (2)	15/16 (4)	19/19 (1)	16/16 (4)

* Die Nachweisraten werden als die Anzahl der positiven Replikate im Verhältnis zur Gesamtzahl der positiven und negativen Replikate angegeben. Die Zahlen in Klammern, wenn vorhanden, geben die Anzahl der nicht schlüssigen Replikate an. In diesen Fällen liegt die Gesamtzahl der positiven und negativen Replikate unter 20.

Tabelle 19 fasst die endgültigen LoD-Werte für jede Kombination aus Extraktionsmethode und Echtzeit-PCR-System zusammen. Diese Werte stellen die Anzahl der viralen Kopien pro µl Nukleinsäureextrakt dar, die vom Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit in mindestens 95 % der Zeit nachgewiesen werden können.

Tabelle 19 Endgültige Nachweisgrenze – LoD für die jeweilige Nukleinsäure-Extraktionsmethode auf dem jeweiligen Echtzeit-PCR-System (Agilent AriaMx, ABI 7500 und Bio-Rad CFX96)

Nukleinsäure-Extraktionsmethode	Nachweisgrenze des gesamten Assays (Kopien/µl)		
	AriaMx	7500	CFX96
QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit mit QIAsymphony (automatisierte Extraktion)	1,5	1	1,5
MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit mit KingFisher Flex (automatisierte Extraktion)	1	1,5	1,5

Analytische Inklusivität

Die Oligonukleotid-Primer und -Sonden für die viralen N1- und N2-Ziele und das humane RNase P-Gen weisen sowohl im Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit als auch im CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only eine identische Sequenz auf. Die Inklusivität dieses Panels wurde kürzlich festgestellt.

Kreuzreaktivität

Die Oligonukleotid-Primer und -Sonden für die viralen N1- und N2-Ziele und das humane RNase P-Gen weisen sowohl im Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit als auch im CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only eine identische Sequenz auf. Die Kreuzreaktivität dieses Panels wurde kürzlich festgestellt.

Klinische Auswertung

Eine klinische Auswertungsstudie wurde mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit unter Verwendung von menschlichen, nasopharyngealen (NP) Abstrichproben durchgeführt. Für jede Testbedingung wurden insgesamt 80 Proben getestet: 40 negative NP-Proben und 40 positive NP-Proben. Der positive oder negative Status für jede Probe wurde durch einen qRT-PCR-Assay mit Notfallzulassung (EUA) für SARS-CoV-2 bestätigt. Das Ziel der klinischen Auswertung war die Beurteilung der klinischen Übereinstimmung (positiv/negativ) der mit dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit erzielten Testergebnisse mit denen des qRT-PCR-Vergleichs-Assays mit EUA für SARS-CoV-2.

Die Nukleinsäureextraktion wurde bei jeder Probe unter Verwendung der beiden unterstützten automatisierten Extraktionsplattformen (QIAGEN QIAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit mit QIAsymphony SP und Thermo Fisher Scientific MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit mit KingFisher Flex Purification System) unter Verwendung des Herstellerprotokolls und der Empfehlungen in dieser Gebrauchsanweisung durchgeführt. Jede extrahierte Probe wurde dann auf allen drei unterstützten Echtzeit-PCR-Systemen (Agilent AriaMx, ABI 7500 und Bio-Rad CFX96), wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben, getestet. Somit wurde jede Probe in

dieser Studie unter sechs (6) verschiedenen Bedingungen getestet. Als Zulassungskriterium war eine positive und negative Übereinstimmung von mindestens 95 % zwischen dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit und dem Vergleichs-Assay erforderlich. Die Ergebnisse der Übereinstimmung sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.

Tabelle 20 Positive prozentuale Übereinstimmung (PPA), negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) und Gesamtübereinstimmung (OA) zwischen dem Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit und dem qRT-PCR-Vergleichs-Assay mit EUA für SARS-CoV-2

Extraktionsplattform:	QIAsymphony	QIAsymphony	QIAsymphony	KingFisher	KingFisher	KingFisher
Echtzeit-PCR-System:	AriaMx	7500	CFX96	AriaMx	7500	CFX96
PPA	97,4 %	100,0 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
NPA	100,0 %	97,5 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %
OA	98,7 %	98,8 %	100,0 %	97,5 %	97,5 %	97,5 %

10 Literaturhinweise

Produktetiketten **84**

Dieses Kapitel enthält Kopien der Produktetiketten für das Agilent SARS-CoV-2 qRT-PCR Dx Kit.

Produktetiketten

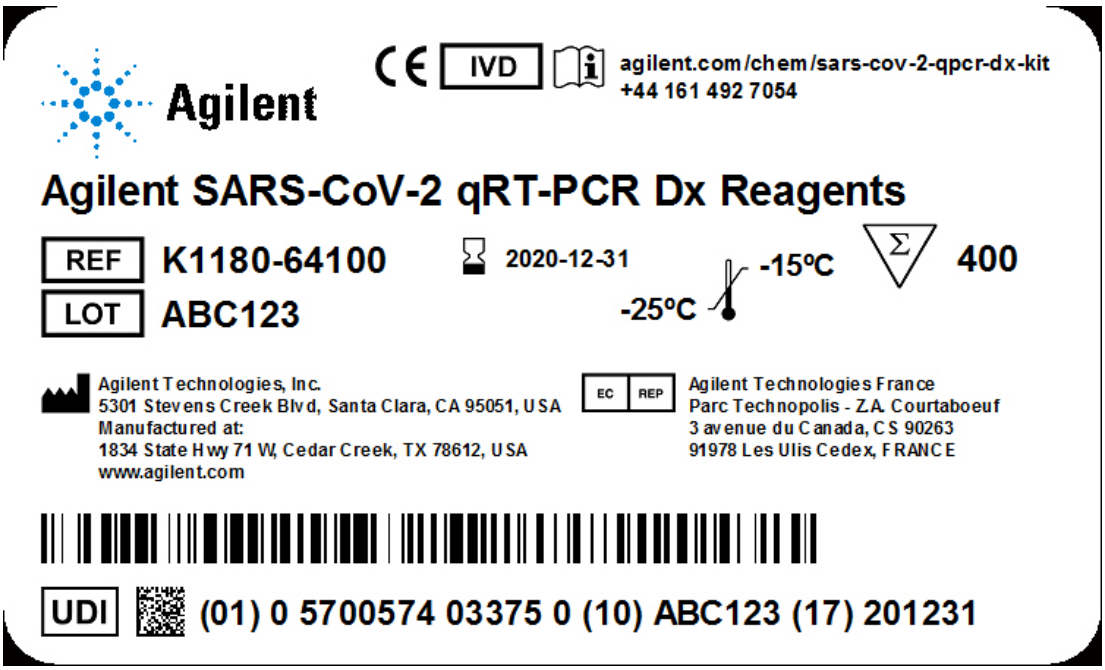


Abbildung 37 Kartonetikett für K1180-64100

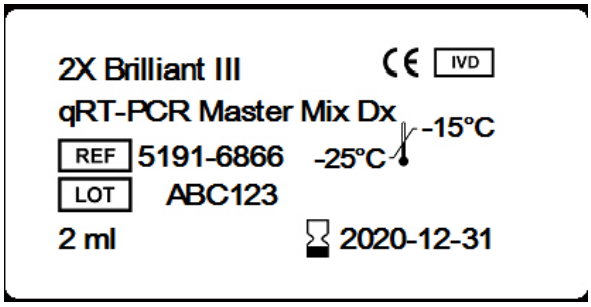


Abbildung 38 Flaschenetikett für 5191-6866

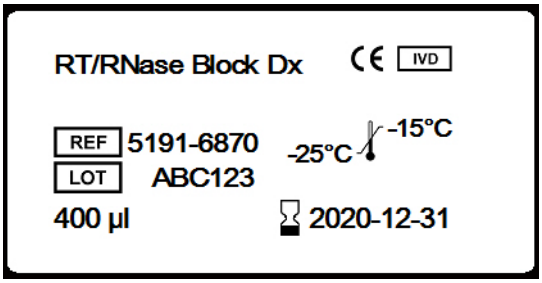


Abbildung 39 Röhrchenetikett für 5191-6870

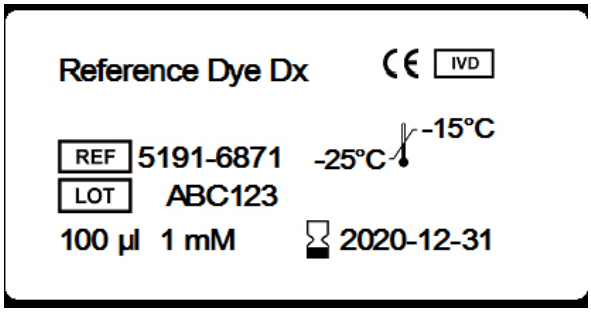


Abbildung 40 Röhrchenetikett für 5191-6871

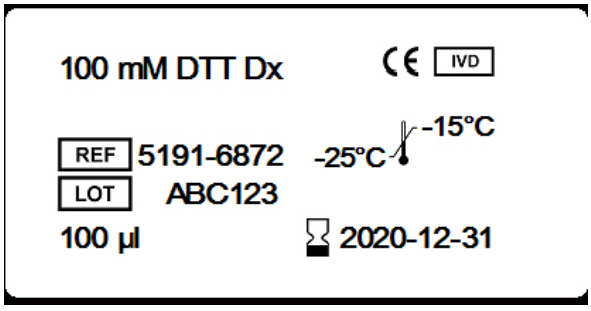


Abbildung 41 Röhrchenetikett für 5191-6872

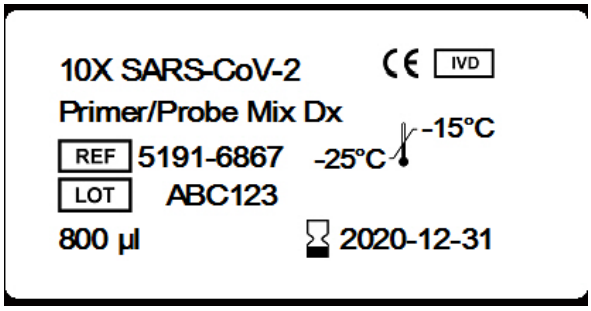


Abbildung 42 Röhrchenetikett für 5191-6867

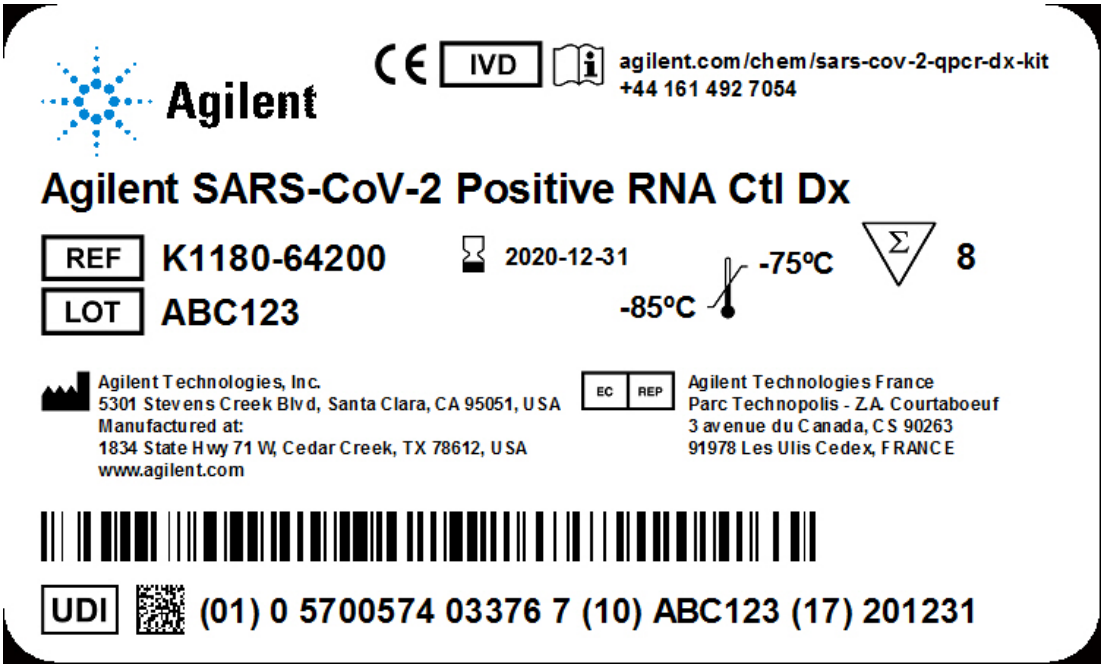


Abbildung 43 Kartonetikett für K1180-64200

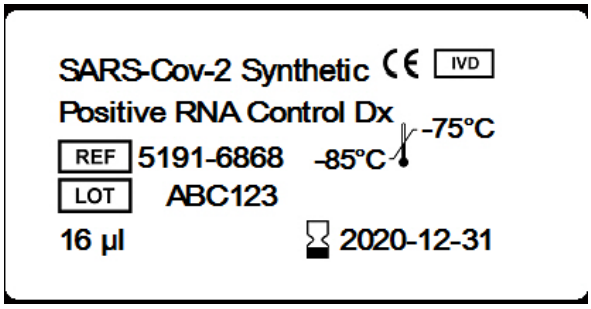


Abbildung 44 Röhrchenetikett für 5191-6868

www.agilent.com

Hergestellt von

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
Hergestellt in:
1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

Autorisierte Vertretung für die Europäische Union

CE IVD

AGILENT TECHNOLOGIES FRANCE
PARC TECHNOPOLIS – ZA COURTABOEUF
3 AVENUE DU CANADA
CS 90263
91978 LES ULIS CEDEX
FRANCE

Technischer Kundendienst von Agilent

Unter **www.agilent.com/en/contact-us/page** finden Sie länderspezifische Telefonnummern
Oder senden Sie eine E-Mail an **covid.support@agilent.com**

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Kein Teil dieses Handbuchs darf ohne die vorherige schriftliche Zustimmung von Agilent Technologies, Inc. in irgendeiner Form oder mit irgendwelchen Mitteln (einschließlich elektronische Speicherung und Abruf oder Übersetzung in eine andere Sprache) entsprechend den Urheberrechtsgesetzen der Vereinigten Staaten und internationalem Urheberrecht reproduziert werden.

© Agilent Technologies, Inc. 2021–2022

Version B1, Februar 2022

Agilent